

**Lutropin (LH)-Bestimmungen im Rinderblut
mit Hilfe eines In-vitro-Biotests
(Radioligand-Rezeptortest)**

Christiane Menzer

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555625_0031

Aus dem Institut für Physiologie
der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft Weihenstephan
der Technischen Universität München

Direktor: Professor Dr. Heinrich Karg

Lutropin (LH)-Bestimmungen im Rinderblut
mit Hilfe eines In-vitro-Biotests
(Radioligand-Rezeptortest)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Christiane Menzer
aus München

München 1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. H. Karg
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. I. Rüsse



Tag der Promotion: 25. Februar 1977

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
Vorbemerkung	1
1. Literaturteil	2
1.1. Charakterisierung des Lutropins (LH)	2
1.1.1. Chemische und physikalische Eigenschaften	2
1.1.2. Heterogenität von Molekülen mit LH-aktivität	4
1.2. Wirkungsmechanismus des LH am Erfolgsorgan	7
1.2.1. Prinzip der Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung	7
1.2.2. Charakterisierung der Bindungsstellen für LH	12
1.2.2.1. Lokalisierung der LH-Rezeptoren	12
1.2.2.2. Art und Struktur der LH-Rezeptoren	14
1.2.3. Physiologie der Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung	15
1.2.3.1. Wirkung am Ovar	15
1.2.3.2. Wirkung am Hoden	18
1.3. Der Radioligand-Rezeptortest	19
1.3.1. Entwicklung von Rezeptortests	19
1.3.2. Rezeptorquellen	20
1.3.3. Prinzip des Rezeptortests	20
1.4. Der Rezeptortest zur Messung von LH und HCG in Serum	22
1.5. Vergleich verschiedener Testsysteme zur LH-Bestimmung	23

	Seite
2. Methodischer Teil	26
2.1. Rezeptorgewinnung	26
2.2. Rezeptorkonservierung	27
2.3. Markierung von HCG	27
2.4. Inkubation und Meßtechnik	29
2.5. Tastversuche zur unmittelbaren Anwendung des Rezeptortests für LH im Rinderblut	29
2.6. Fällungsmethoden	30
2.6.1. Alkoholfällung	33
2.6.2. Ammoniumsulfatfällung	33
2.7. Versuche zur Gewinnung serumspezifischer Blindwerte nach Zerstörung der LH-Aktivität	34
2.8. Abtrennung von Serum-LH mittels Säulenchro- matographie	35
2.8.1. Anionenaustauscher	35
2.8.2. Kationenaustauscher	35
2.9. Standardkurve	39
2.10. Spezifität	41
2.11. Identität zwischen endogenem LH und Standard- LH	41
2.12. Reproduzierbarkeit	44
2.12.1. Reproduzierbarkeit der Säulenreinigung über CM-Sephadex C-50	44
2.12.2. Reproduzierbarkeit des Rezeptortests	45
2.13. Versuche zur Erhöhung der Testempfindlichkeit	46

	Seite
3. Physiologische Ergebnisse und Vergleich mit radio-immunologisch gemessenen Werten	51
3.1. LH-Werte während des physiologischen Zyklus weiblicher Rinder	51
3.2. LH-Werte nach Injektion von Gn-RH	55
3.3. LH-Werte nach PMSG-Injektion	55
3.4. Relation der Ergebnisse aus RRT und RIT	60
4. Diskussion	65
5. Zusammenfassung	72
6. Literaturverzeichnis	75
Lebenslauf	106

ABKÜRZUNGEN

ACTH	= Adrenocorticotropin
ATP	= Adenosintriphosphat
cAMP	= zyklisches 3', 5'-Adenosinmonophosphat
EDTA	= Äthylendiamintetraessigsäure
FSH	= Follitropin
GH	= Wachstumshormon
Gn-RH	= Gonadoliberin, Gonadotropin Releasinghormon
HCG	= humanes Chorion Gonadotropin
hLH	= humanes Lutropin
i.m.	= intramuskulär
i.v.	= intravenös
IU	= Internationale Einheit
J	= Jod
LH	= Lutropin, Luteinisierungshormon
NADP	= Nicotinsäureamid-adenindinucleotid-phosphat
OAAD	= Ovarian Ascorbic Acid Depletion- (Ovaraskor- binsäure-) Test
PMSG	= Pregnant Mare Serum Gonadotropin
RIT	= Radioimmunotest
RRT	= Radioligand-Rezeptortest
s	= Standardabweichung
TSH	= Thyreotropin
V_k	= Variationskoeffizient
VPW	= Gewichtstest der ventralen Prostata
$\bar{x}$	= Mittelwert

VORBEMERKUNG

Mit der Entwicklung des Radioimmunotests war es möglich geworden, LH im Rinderblut auch in niedrigsten Konzentrationen nachzuweisen. Da mit diesem Test das LH in einfacher Weise direkt im Serum bestimmt werden konnte, wurde er bald in großem Umfang zur Aufklärung physiologischer Funktionen, sowie zur klinischen Diagnostik angewandt. Es blieb jedoch die Frage offen, ob mit dem Radioimmunotest, bei dem nur die immunologisch aktive Bindungsstelle des Hormonmoleküls erfaßt wird, auch eine zuverlässige Aussage über die biologische Wirksamkeit erhalten wird. Biologische Testmethoden, wie vor allem der Ovaraskorbinsäuretest konnten nur begrenzt zur Klärung dieser Frage eingesetzt werden; Empfindlichkeit, sowie auch Genauigkeit lagen weit unter der des Radioimmunotests, die großen hierdurch erforderlichen Blutmengen erlaubten nur eine geringe Entnahmehäufigkeit.

Der Radioligand-Rezeptortest erfaßt die biologische Aktivität von LH direkt an den Zellen des Erfolgsorgans, sodaß eventuell durch den Metabolismus im Testtier bedingte Schwankungen des in-vivo-Biotests vermieden werden können. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, dieses Testprinzip auch zur LH-Bestimmung im Rinderblut in Anwendung zu bringen, insbesondere um damit Vergleiche mit der radioimmunologischen Testmethode anstellen zu können.

1. LITERATURTEIL

1.1. Charakterisierung des Lutropins (LH)

1.1.1. Chemische und physikalische Eigenschaften

Das Luteinisierungshormon LH, nach neuer Nomenklatur (IU-PAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature 1975) als Lutropin bezeichnet, wird in den basophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet und unter dem Einfluß eines hypothalamischen Releasing-Hormons freigesetzt.

Zur genauen Charakterisierung dieses gonadotropen Hormons wurden Methoden entwickelt, um LH aus Hypophysenextrakten in möglichst reiner Form darzustellen.

Innerhalb des gleichen Jahres gelang es zwei Arbeitsgruppen, Squire & Li (1959) und Ward, McGregor & Griffin (1959), Verfahren für die Präparation von hochgereinigtem ovinem LH zu erarbeiten. Schaf-LH erwies sich als neutrales Protein mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 7,1 - 7,3, einem Molekulargewicht von etwa 30 000 und einem Kohlenhydratanteil von etwa 15 %. Im Gegensatz zu humanem LH enthält Schaf- und Rinder-LH keine Sialinsäure (Papkoff 1971, Bahl 1971). Li & Starman (1964) zeigten durch analytische Ultrazentrifugation, daß LH in stark saurem Milieu in zwei Einheiten dissoziiert. Papkoff & Samy (1967) konnten feststellen, daß Schaf-LH aus zwei chemisch unterschiedlichen, nicht kovalent gebundenen Untereinheiten ("Subunits") besteht, die als α - und β -Untereinheiten bezeichnet werden. Der Subunit-Charakter folgender Glykoproteidhormone konnte inzwischen erkannt werden für LH (De la Llosa, Courte, Jutisz für Schaf-LH 1967, Reichert & Midgley für human-LH 1968), für TSH (Pierce, Wynston, Carsten für bovines TSH 1958), für FSH (Papkoff & Ekblad für Schaf-FSH 1970, Rathnam & Saxena für human-FSH 1972) und für HCG

(Swaminathan & Bahl 1970, Morgan & Canfield 1971).

In den letzten Jahren wurden von den folgenden Arbeitsgruppen Versuche zur biochemischen Charakterisierung von LH verschiedener Spezies, sowie HCG unternommen.

Rinder-LH	Maghuin-Rogister & Hennen	1971
	Maghuin-Rogister & Dockier	1971
	Maghuin-Rogister & Hennen	1973
Schweine-LH	Hennen, Prusik, Maghuin-Rogister	1971
	Maghuin-Rogister, Combarnous, Hennen	1973
Schaf-LH	Liu, Nahm, Sweeney, Lamkin, Baker, Ward	1972
	Liu, Nahm, Sweeney, Holcomb, Ward	1972
	Sairam, Papkoff, Li	1972b
	Sairam, Samy, Papkoff, Li	1972c
Pferde-LH	Landefeld & McShan	1974
human-LH	Sairam, Papkoff, Li	1972a
	Closset, Vandalem, Hennen	1975
	Sairam & Li	1975
HCG	Bahl, Carlsen, Bellisario	
	Swaminathan	1972

Vor allem die Primärstruktur von Schaf-LH konnte bereits vor einigen Jahren aufgeklärt werden: Die α -Untereinheit besteht aus 96 Aminosäuren mit Phenylalanin als NH_2 -terminale und Serin als COOH -terminale Aminosäure. Das Molekül besitzt zwei Kohlenhydratketten (Sairam et al. 1972b). Die β -Untereinheit

besteht aus 120 Aminosäuren mit Serin und Leucin als NH_2 - bzw. COOH -terminalen Aminosäuren und nur einer einzigen Kohlenhydratkette (Sairam et al. 1972c). Die α -Untereinheiten all dieser Hormone sind in Struktur und Wirkung fast identisch, wohingegen die spezifische biologische Aktivität durch die β -Untereinheit bestimmt wird (Reichert, Lawson, Leidenberger, Trowbridge 1973). Tatsächlich sind die α - und β -Untereinheiten austauschbar, wie Rekombinationsversuche gezeigt haben (Reichert; Midgley, Niswender, Ward 1970, Pierce, Bahl, Cornell, Swaminathan 1971, Rathnam & Saxena 1972). Werden z.B. α -Untereinheiten von TSH mit β -Untereinheiten von LH zusammengesetzt, wird LH mit voller biologischer Aktivität erhalten. Die entwicklungsgeschichtlich bedingten Speziesunterschiede beider Untereinheiten zeigen sich am deutlichsten beim Vergleich von Mensch und übrigen Säugern (Wallis 1975). Die biologische Wirksamkeit der isolierten Subunits fehlt. Dies wurde im Biotest sowohl in vivo (De la Llosa & Jutisz 1969) als auch in vitro (Gospodarowicz 1971, Catt, Dufau, Tsuruhara 1973) nachgewiesen.

Die Kombination beider Untereinheiten ist zur Bindung des Hormons an den Rezeptor des Erfolgsorgans und somit zur Stimulation der physiologischen Antwort notwendig (Ramachandran & Sairam 1975). Die Wirkung des Hormons nach dessen Rezeptorbindung ist nicht mit einer Dissoziation in seine Untereinheiten verbunden (Combarrous & Hennen 1974).

1.1.2. Heterogenität von Molekülen mit LH-Aktivität

Auch hochgereinigte Hormonpräparate zeigen bei Polyacrylamid-gelelektrophorese oder nach Fraktionierung mittels Ionenaustauschchromatographie unterschiedliche Komponenten. Diese sogenannte Mikroheterogenität wurde in LH und HCG festgestellt und erklärt sich durch unvollständige Synthese bzw. Schädigung

des Kohlenhydratanteils, durch unterschiedlichen Gehalt und Bindungsart der Sialinsäure und durch geringe Variabilität der Aminosäuresequenz (Bahl 1971, Graesslin, Weisse, Braendle 1973, Roos, Nyberg, Wide, Gemzell 1975, Loeber & Lequin 1975). Als Heterogenität von qualitativ identischen Proteohormonen werden Unterschiede bezüglich der Molekülgröße und der relativen biologischen und immunologischen Reaktivität bezeichnet. Diese Art von Heterogenität wurde für eine Reihe von Hormonen gezeigt, z.B. für Insulin (Steiner, Cunningham, Spigelman, Aten 1968), für Parathormon (Berson & Yalow 1968), Wachstumshormon und Prolaktin (Guyda 1975), sowie humanes LH (hLH) (Rabinowitz, Benveniste, Bell 1974, Graesslin, Leidenberger, Lichtenberg, Glismann, Hess, Czygan, Bettendorf 1976). Beim Vorhandensein eines Moleküls mit höherem Gewicht verglichen mit dem "nativen" Hormon besteht die Möglichkeit, daß eine Prohormonform vorliegt (Steiner et al. 1968). Bei einer Substanz mit niedrigerem Molekulargewicht können zum einen Untereinheiten des betreffenden Hormons vorliegen und zum anderen Abbauprodukte.

Graesslin et al. (1976) fanden zwei Formen von Serum-LH nach Gel-Chromatographie, sog. "big"-LH mit einem Molekulargewicht von 140 000 - 180 000 und "little"-LH (MG ca. 30 000), das gleichzeitig mit radioaktiv-markiertem hypophysärem Standard-LH eluiert wurde. Es konnte noch nicht nachgewiesen werden, daß die größere Molekülform eine Prohormonform darstellt. Das "big"-LH erwies sich als sehr stabil, es scheint nicht eine bloße Aneinanderlagerung von kleinen LH-Formen, oder von diesen an ein Serumprotein zu sein. Ein qualitativer Unterschied zwischen den beiden Formen bezüglich Bindungskinetik an eine Rezeptorpräparation und isoelektrischen Werten besteht nicht. Eine Umwandlung der beiden Formen ineinander scheint nur unter besonderen Umständen möglich. Im Gegensatz zu Q azi,

Romani & Diczfalusy (1974), die mittels Gelchromatographie in Humanserum die biologische Aktivität des LHs auf einen Bereich begrenzt und die immunologische über das ganze Chromatogramm verteilt fanden, stellten Graesslin et al. (1976) eine Übereinstimmung der LH-Aktivitäten im biologischen und immunologischen Meßsystem fest. Übereinstimmung beider Untersucher besteht dahingehend, daß die Immunoreaktivität gleicher Serumfraktionen beträchtlich geringer ist als die biologische Aktivität (RRT/RIT: 2,6 - 6,1 nach Graesslin 1976). Benveniste, Frohman, Rabinowitz (1975) untersuchten zwei hochgereinigte hLH-Präparationen und fanden nach Gel-Chromatographie drei Fraktionen mit LH-Aktivität. Die erste und zweite Fraktion - entsprechend der polymeren und monomeren LH-Form - zeigen sowohl immunologische als auch Rezeptorbindungsaktivität. Eine immunologisch aktive dritte Fraktion, die nur bei einer LH-Präparation gefunden wurde, wird mit der Anwesenheit von α -Subunits erklärt; sie besitzt keine Rezeptorbindungsaktivität.

Griffiths & Godard (1975) fanden nach Gel-Chromatographie von mit ^{125}Jod radioaktiv-markiertem HCG drei Fraktionen, von denen die zwei ersten wiederum die polymere und monomere Hormonform darstellten und beide immunologisch wirksam sind. Die dritte Fraktion ist immunologisch nicht aktiv und nimmt nach längerer Aufbewahrungszeit des markierten Hormons auf Kosten von Fraktion 1 und 2 zu, wird daher mit dem Auftreten von beschädigten Hormonfragmenten oder freiem ^{125}Jod erklärt.

Prentice & Ryan (1975) untersuchten hLH aus Hypophysen, Serum und Urin. Das Elutionsprofil nach Gel-Chromatographie zeigte im Urin zwei immunreaktive Gipfel entsprechend nativem LH und LH α -Subunits. Im Gegensatz zu Serum und Hypophyse wurden keine β -Subunits gefunden. In der Hypophyse

wurde eine große, nicht dissoziierbare LH-aktive Form gefunden. Im Serum und besonders in der Hypophyse existiert ein deutlicher Überschuß an α -Subunits. Die Anwesenheit von exzessivem LH- α wird mit der Synthese eines LH-Prohormons in der Hypophyse erklärt, aus dem durch Abspaltung eines α -ähnlichen Verbindungsstückes das native Hormon entsteht. Eine Bekräftigung dieser Hypothese, wonach α - und β -Untereinheiten nicht getrennt voneinander synthetisiert werden, liefern in-vitro-Versuche mit Subunits, die eine langsame und wenig effiziente Rekombination und eine größere Kombinationsrate von Hybridformen (z.B. HCG α /LH β) zeigen, als von homologen Formen (Reichert, Lawson, Leidenberger, Trowbridge 1973).

1.2. Wirkungsmechanismus des LH am Erfolgsorgan

1.2.1. Prinzip der Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung

Der Mechanismus, durch welchen die für ein Proteohormon charakteristische funktionelle Antwort eingeleitet wird, ist die Bindung an einen bestimmten hochspezialisierten Teil der Zellmembran des Erfolgsorgans, den sogenannten Rezeptor. Der Vorgang ist reversibel, das Hormon wird während der Bindung nicht inaktiviert oder geschädigt (Dufau, Catt, Tsuruhara 1972a). Für die weiteren biochemischen Ereignisse, die der Bindung folgen, gibt es verschiedene Theorien. Sie folgen dem ursprünglichen Modell vom "2nd messenger", das von Robison, Butcher & Sutherland (1967) eingeführt wurde. Das System besteht aus zwei Einheiten, einer Regeleinheit (Diskriminator) auf der Membranaußenseite, dem eigentlichen Rezeptor, und einer damit verbundenen katalytischen Einheit (Amplifier) an der Membraninnenseite. Die Hormonbindung führt

zur Aktivierung der katalytischen Einheit, der Adenylzyklase, die wiederum die Bildung von zyklischem 3', 5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) im Zytoplasma veranlaßt. cAMP gilt als wesentlicher "2nd messenger", der die hormonspezifische Zellantwort vermittelt. Birnbaumer, Pohl, Kraus, Rodbell (1970), Perkins (1973), und Cuatrecasas (1974b) schlugen ein Modell vor, wonach Rezeptor- und katalytische Einheit getrennte Strukturen und auf der Zellmembran fließend beweglich sind. Erst nach der Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes kommt es durch laterale Verschiebung zu einer Verbindung mit der katalytischen Einheit. Birnbaumer et al. (1970) modifizierte das Modell, indem er zwischen Regel- und katalytischer Einheit eine Überleitungs- oder "Transducer"-Einheit einführte, die den Bindungsmechanismus der beiden Einheiten erklärt. Eine weitere Regeleinheit schlug Rodbell et al. (1975) vor, um den Einfluß von Guanylnukleotiden auf das Glukagon-Adenylzyklase-System der Leber zu erklären.

LH veranlaßt die Synthese der Steroid-Hormone Progesteron im Gelbkörper des Ovars und Testosteron im Hoden. Haynes & Berthet (1957) zeigten zuerst den Zusammenhang zwischen cAMP und Steroidgenese. Zyklisches AMP erfüllt die Rolle des sogenannten "2nd messenger", indem exogen zugefügtes cAMP sowie Dibutyryl-Derivate von cAMP am Erfolgsorgan die gleiche Wirkung zeigen wie das Hormon (Marsh & Savard 1966, Dufau, Catt, Tsuruhara 1971, Catt, Watanabe, Dufau 1972), wenn auch die hierzu erforderliche Konzentration die endogene weit übersteigt. Die zu erwartende zeitliche Folge des Anstiegs der cAMP-Konzentration, einer cAMP-abhängigen Proteinkinase und der Steroidgenese nach Hormonstimulation ist nur bei hoher Hormondosierung zu beobachten (Marsh & Savard 1966, Dufau, Watanabe, Catt 1973). In Versuchen mit niedriger LH-Konzentration konnte die Steroidproduktion ohne meßbare Änderungen der cAMP-Konzentration veranlaßt werden. Marsh, Ling & Lemaire

(1976) bekräftigen jedoch die Rolle von cAMP als wesentlichem Vermittler der Steroidgenese durch Untersuchungen, die zeigen, daß auch bei niedriger LH-Dosierung die Proteinkinase-Aktivität steigt. Pliska (1976) erklärt das Fehlen meßbarer cAMP-Konzentrationen mit dem Modell eines Sequenzablaufes: Nach der Hormonstimulierung kommt es zu einem stufenweisen Signalfuß von Rezeptor zu Effektor. Auf der anderen Seite nimmt die cAMP-Anreicherung auch nach Erreichen der maximalen Steroidproduktion noch zu (Catt & Dufau 1973a, Moyle & Ramachandran 1973). Auch für das ACTH-Nebennierenrinden-System wurden ähnliche Ergebnisse gefunden (Beall & Sayers 1972).

Catt & Dufau (1973a) demonstrierten anhand von Bindungsstudien an Leydig-Zellen, daß nur etwa 1 % der gesamten LH-Rezeptoren von Lutropin besetzt sein muß, um eine maximale Testosteronproduktion zu erreichen. Die Funktion der überzähligen oder "spare" Rezeptoren ist noch Anlaß für Spekulationen und Interpretationen. Andererseits konnten Ryan & Lee (1976) unter anderen Versuchsbedingungen keine überzähligen Rezeptoren nachweisen.

Zyklisches Adenosinmonophosphat ist sicher der wesentlichste Vermittler für die Peptidhormonwirkung, es ist jedoch möglicherweise nicht der einzige. Besonders Calciumionen scheinen eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Zellantwort zu spielen (Rasmussen 1970, Neher & Milani 1976). Die Wirkung verschiedener LH-Derivate auf die ovarielle Adenylzyklase weist auf die Rolle des Ca^{++} im Aktivierungsmechanismus hin: Ein sehr wirksames Methyl-LH-Derivat verliert nach Zugabe von Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) aufgrund einer Chelatbildung mit Ca^{++} -Ionen an Wirksamkeit (Tertrin-Clary & De la Llosa 1976).

Der weitere Weg der cAMP-Wirkung erfolgt über die Aktivierung einer Proteinkinase, einem in fast allen tierischen

Zellen vorkommenden Enzym. Dieses Enzym soll über die Phosphorylierung noch unbekannter zellspezifischer Substrate wirken. Simpson, Dufau, Podesta, Catt (1976) fanden, daß nach der Aktivierung der Proteinkinase durch Abspaltung einer katalytischen Untereinheit eine Phosphorylierung von Nukleoprotein-Komponenten stattfindet.

LH und cAMP greifen bei der Steroidhormonproduktion in den Syntheseschritt zwischen Cholesterin und Pregnenolon ein. Marsh (1976) schlägt eine Reihe möglicher Wege vor, wie diese Reaktion in Gang gebracht werden kann.

1. cAMP könnte die Steroidproduktion beschleunigen indem es über die Aktivierung von Phosphorylase eine Konzentrationszunahme eines Kofaktors, z.B. Nikotinsäureamid-adenindinucleotid-phosphat (NADPH), bewirkt, der für die Steroidgenese notwendig ist.
2. Die Konzentrationszunahme des Substrates Cholesterin könnte durch cAMP veranlaßt werden. Dieser Schritt könnte erfolgen durch die Umwandlung von Cholesterinester in Cholesterin sowohl über die Aktivierung von Cholesterinesterase als auch über die Hemmung von Cholesterinestersynthetase.
3. Da die Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon im Mitochondrion erfolgt, könnte der erleichterte Transport von Cholesterin, evtl. über ein cholesterinbindendes Protein, in diese Organelle ein von LH bzw. cAMP bewirkter Schritt sein.
4. Einen weiteren möglichen Einfluß könnte cAMP direkt auf das Enzymsystem des Umwandlungsvorgangs von Cholesterin in Pregnenolon (Abbau der Seitenkette) besitzen.
5. Es gibt Hinweise dafür, daß Pregnenolon erst außerhalb des Mitochondrion in Progesteron umgewandelt werden kann, sodaß der Angriffspunkt des Hormons die Ausschleusung von Pregnenolon aus dem Mitochondrion sein könnte.

Die soeben aufgeführten Möglichkeiten sind in Abb. 1 noch einmal zusammengefaßt. Es ist noch nicht möglich zu entscheiden, welcher Wirkungsmechanismus von cAMP der richtige ist, und es kann sein, daß verschiedene Effekte bis zur vollständigen Steroidsynthese nötig sind.

Im Gegensatz zu den Steroidhormonen, deren Wirkung direkt in die Proteinbiosynthese eingreift, gibt es bisher nur wenig Information über die Rolle der Proteinsynthese durch Peptidhormone. Allerdings kann die Langzeitwirkung von Peptidhormonen, wie Aufrechterhaltung von Zelldifferenzierung und Kontrolle von Zellzahl und -größe nur durch die Synthese von Zellproteinen erklärt werden. Es gibt Hinweise, daß das Adenylzyklase-cAMP-Proteinkinasesystem auch die Fähigkeit besitzt, die Proteinsynthese zu regulieren (zit. aus Catt & Dufau 1976).

1.2.2. Charakterisierung der Bindungsstellen für LH

1.2.2.1. Lokalisierung der LH-Rezeptoren

Um die Wirkungsweise von gonadotropen Hormonen kennenzulernen, war es notwendig, genaue Kenntnis des Wirkungsortes zu erlangen.

Radioautographische und histologische Studien ließen die Leydig'schen Zwischenzellen des Hodens (Mancini, Castro, Seigneur 1967, De Kretser, Catt, Burger, Smith 1969, De Kretser, Catt, Paulsen 1971), sowie Corpus luteum-, Granulosa- und Thekazellen des Ovars von Ratte und Maus (Eshkol & Lunenfeld 1968, Espeland, Naftolin, Paulsen 1968, Rajaniemi & Vanha-Perttula 1972, Danzo, Midgley, Kleinsmith 1972) als spezifische Bindungsstellen für LH

bzw. HCG erkennen. In anderen Organen wie Niere, Nebenniere, Leber, Thymus, Muskel, Blut konnte keine spezifische, d.h. durch kaltes Hormon kompetitiv hemmbare Bindung von radioaktiv markiertem Hormon festgestellt werden (Lee & Ryan 1971, Braendle, Breckwoltd, Graesslin, Weise 1973). Niedrige ¹²⁵Jod-HCG-Konzentrationen in Leber und Niere der Ratte nach in-vivo-Injektion können eine Folge von Hormonverteilung ohne Rezeptorbindung sein (De Kretser et al. 1971). Ob das Hormon auch außergonadale Wirkungen hat, muß noch aufgeklärt werden (Ryan & Lee 1976). Spezifische Bindungsstellen wurden auch im Gelbkörper des Rinderovars (Marsh, Butcher, Savard, Sutherland 1966, Gospodarowicz 1973, Menon & Kiburz 1974) und in Granulosazellen des Schweineovars (Kammerman, Canfield, Kolena, Channing 1972) nachgewiesen.

Mit Hilfe von elektronenmikroskopischer Radioautographie wurde die Außenseite der Plasmamembranen von Luteal-, Granulosa- und Thekazellen des Rattenovars als Ort der spezifischen LH-Bindung erkannt (Han, Rajaniemi, Cho, Hirshfield, Midgley 1974). Für die Lokalisation des Rezeptors an der Zellmembran spricht, daß Sepharose-gekoppeltes Hormon seine Wirkung, ohne in die Zelle eindringen zu können, ausüben kann (Cuatrecasas 1969). Bei Fraktionierung der Zellen findet sich der Hauptteil des gebundenen Hormons in der Membranfraktion (Gospodarowicz 1973, Rajaniemi, Hirshfield, Midgley 1974). Die Möglichkeit der Dissoziation des Hormons vom Rezeptor ohne den Verlust der biologischen Wirksamkeit wäre bei einer intrazellulären Lokalisation unwahrscheinlich (Catt & Dufau 1973b). Versuche von Anderson & Ryan (1976), die eine geringe, jedoch signifikante Konzentration markierten Hormons über dem Zellkern fanden, halten einen Hormon-Transport in die Zelle jedoch nicht für ausgeschlossen. Weitere Untersuchun-

gen hinsichtlich der Lokalisation der Bindungsstellen auf der Zellmembranoberfläche wurden mit Scanning-Elektronenmikroskopie durchgeführt (Chang et al. 1975, zit. aus Lee 1976). Gleichzeitig mit der Zunahme von Bindungsstellen an wachsenden Granulosazellen des Schweinefollikels ändert sich die zunächst glatte Oberfläche durch Ausbildung vieler Mikrovilli. Ob die Rezeptorstellen sich an diesen Mikrovilli befinden, sowie die Frage nach deren Schicksal bei der Transformation der Granulosa- in Lutealzellen, ist noch ungeklärt.

1.2.2.2. Art und Struktur der LH-Rezeptoren

Die Bezeichnung Rezeptor für Hormonbindungsstellen, analog dem Originalgebrauch in der Pharmakologie, kennzeichnet den noch herrschenden Mangel an Kenntnis über die molekulare Struktur des Wirkungsortes von Peptid- und Proteohormonen. Die Behandlung von Membranpräparationen mit proteolytischen und lipolytischen Enzymen führt zur Inaktivierung des Bindungsvermögens, was für den Lipoproteincharakter der Rezeptoren spricht (Lee & Ryan 1973a, Charreau, Dufau, Catt. 1974). In den letzten Jahren wurden Versuche unternommen, durch Ablösung der Rezeptoren von der Membran genauere Kenntnis über deren Natur zu erhalten. Mit nichtionischen Detergentien wie Triton X 100 und Lubrol PX gelang die Ablösung von Rezeptoren mit Erhaltung von Spezifität und hoher Bindungsaffinität für LH und HCG (Dufau & Catt 1973, Dufau, Charreau, Catt 1973, Haour & Saxena 1974, Lee & Ryan 1974a, Bellisario & Bahl 1975). Die hierbei durch Gel-Filtration und Dichte-Gradienten-Zentrifugation erhaltenen Ergebnisse für Hodenrezeptoren stimmen mit denen von Ovarrezeptoren gut überein, was für einen gleichartigen makromolekularen Aufbau spricht (Dufau,

Charreau, Ryan, Catt 1974). Der freie Rezeptor verhält sich als asymmetrisches 6,5 S Makromolekül mit einem Stokes-Radius von 60 - 64 Å. Der Hormon-Rezeptor-Komplex, gebildet vor der Ablösung, besitzt eine Sedimentationskonstante von 8,8 S, nach der Ablösung eine solche von 7,5 S. Das Molekulargewicht der abgelösten Rezeptoren wird in einer Größenordnung von 200 000 - 300 000 Daltons errechnet.

Vergleichende Untersuchungen von in vivo und in vitro gebildeten Rezeptor-Hormon-Komplexen ließen hinsichtlich der physikalischen Eigenschaften nach Ablösung durch verschiedene Detergentien keinen Unterschied erkennen (Dufau, Podesta, Catt 1975). Auf weitere Möglichkeiten der Ablösung von LH-Rezeptoren mit Hilfe von Ultraschallbehandlung und Lithium-Diiodo-Salizylat weisen Leidenberger, Pahnke, Braendle, Graesslin (1974) hin. Lee & Ryan (1974a) sowie Dufau, Ryan, Baukal, Catt (1975) unternahmen die weitere Reinigung von LH/HCG-Rezeptoren. Mit Detergens abgelöste Rezeptoren aus Rattenhoden wurden mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die so erhaltenen reinen Rezeptoren zeigten noch 50 % der maximalen theoretischen Bindungsaktivität und behielten die ursprüngliche hohe Bindungsaffinität und Hormonspezifität (Dufau et al. 1975).

1.2.3. Physiologie der Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung

1.2.3.1. Wirkung am Ovar

Die Funktionen des Ovars werden durch das Zusammenwirken verschiedener Hormone, die wechselnde Verfügbarkeit von Bindungsstellen für diese Hormone und der sich dadurch verändernden Antwortbereitschaft des Gewebes ermöglicht.

Der Hormoneinfluß auf die Entwicklung der ovariellen Funktionsgebilde wurde am intensivsten bei der Ratte untersucht.

Während des Follikelwachstums wurde die LH/HCG-Bindung radioautographisch bestimmt. An kleinen Follikeln fehlt jegliche LH/HCG-Bindung, an mittelgroßen Follikeln wird das Hormon im Bereich der Theka interna gebunden und in den großen, präovulatorischen Follikeln an den Thekazellen und zu einem geringeren Teil auch an den 3 - 4 äußeren Zellagen der Theka granulosa. An der Eizelle selbst und in deren direkter Nachbarschaft wird kein LH gebunden (Amsterdam, Koch, Lieberman, Lindner 1975). Auch in Follikeln des Schafovors wird LH fast ausschließlich an den Thekazellen gebunden, wo auch eine entsprechende cAMP-Anreicherung stattfindet. Die während der Luteinisierung zunehmende LH-Rezeptorbindung an Granulosazellen ist nach Weiß, Seamark, McIntosh, Moor (1976) nicht mit einer Zunahme der Adenylzyklaseaktivität verbunden. Diese Autoren diskutierten daher einen möglichen Übertritt von cAMP über den Zwischenzellraum zur Theka granulosa. Channing & Coudert (1976) zeigten an Ovarfollikeln von Rhesusaffen, daß die hauptsächliche Steroidhormonsekretion von den Thekazellen ausgeht. An Granulosazellkulturen von Schweinen (Kammerman & Ross 1975) wurde gezeigt, daß mit zunehmender Follikelgröße die Zunahme der Bindungskapazität, sowie die Reaktionsfähigkeit der Zelle für LH bzw. HCG als Folge zunehmender Rezeptorzahl und nicht als Folge erhöhter Bindungsaffinität abläuft. Die Zunahme der Rezeptorzahl pro Zelle korreliert hier gut mit dem Anstieg der HCG-abhängigen Adenylzyklase-Aktivität (Lee 1976).

Was führt nun zu dieser wachsenden Empfindlichkeit des Follikels für LH, der zuletzt, als Antwort auf die prä-

ovulatorische LH-Ausschüttung, mit Ovulation und Luteinisierung reagiert?

Channing (1975) und Zeleznik, Midgley, Reichert (1974) führen die Stimulation der LH-Rezeptorbildung bzw. -verfügbarkeit auf einen direkten Einfluß von FSH zurück. Nicht nur für FSH, sondern auch für Östradiol besitzt der Follikel Rezeptoren. Da Östrogene die FSH-Bindung an Follikel hypophysektomierter Ratten erhöhen (Richards 1975), hielten Lee & Ryan (1974b) die LH-Rezeptor-stimulierende Wirkung des FSH nur über vorhergehenden Östrogeneinfluß für wahrscheinlich. Die Entscheidung über Atresie oder Weiterentwicklung des Follikels ist von dem zeitgerechten Zusammenspiel von Östradiol und Gonadotropinen abhängig (Richards & Midgley 1976). Sowohl Atresie als auch Luteinisierung sind mit dem Verlust der nukleären Östradiolrezeptoren verbunden.

Die Umwandlung der Granulosazellen in Lutealzellen wird ebenfalls durch eine Folge von Hormonstimuli eingeleitet. Die Luteinisierung ist gekennzeichnet durch Zunahme der Lutealzellrezeptoren für LH und zunehmende Progesteronproduktion. Während der frühen Gelbkörperphase wirkt Prolaktin bei der Ratte stimulierend auf die LH-Rezeptorbildung. Da Östrogen die Prolaktin-Freisetzung erhöht, könnte es indirekt auf die LH-Rezeptorbildung einwirken (Holt, Richards, Midgley, Reichert 1976).

Während der Trächtigkeit der Ratte nimmt die Bindung von Östradiol und LH vom 8. - 12. Tag an zu und fällt erst am Ende ab. Die Prolaktinbindung ist zu Beginn der Trächtigkeit hoch und fällt um den 8. - 12. Tag ab (Richards & Midgley 1974). Die Funktion des Gelbkörpers des Rattenovars ist abhängig von den luteotropen Hormonen LH und

Prolaktin. Während der Gravidität verliert der Gelbkörper des Menschen seine HCG-Bindungsfähigkeit, wogegen der Gelbkörper des Rindes während der gesamten Trächtigkeit funktionsfähige Rezeptoren behält. Dies stimmt mit der Tatsache überein, daß der Gelbkörper beim Menschen für die Aufrechterhaltung der Gravidität nicht notwendig ist, wohl aber beim Rind (Rao 1975).

Beim Rhesusaffen ist in Kulturen luteinierter Granulosazellen die kontinuierliche Zufuhr von LH erforderlich, um die Lutealzellfunktion aufrechtzuerhalten (Channing 1974).

Der Abfall der Progesteronproduktion kennzeichnet den Beginn der Luteolyse. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ hat u.a. bei der Ratte luteolytischen Effekt. Da die $PGF_{2\alpha}$ -Wirkung eine Reduzierung der Progesteronproduktion bereits vor einem Verlust von LH-Rezeptoren bewirkt, wird ein direkter Antagonismus zu LH angenommen. Es besteht jedoch keine Konkurrenz um die Rezeptorbindung. Auch die luteotrope Prolaktinwirkung bei der Ratte wird durch $PGF_{2\alpha}$ aufgehoben (Hichens, Grinwich, Behrman 1974, Grinwich, Hichens, Behrman 1976).

1.2.3.2. Wirkung am Hoden

Die Ausbildung des männlichen Phänotyps ist abhängig von der Testosteronproduktion im Fetus. Frowein & Engel (1974) wiesen im Hoden der pränatalen Ratte spezifische LH/HCG Bindung nach. Versuche von Catt, Dufau, Neaves, Walsh, Wilson (1975) an Kaninchenembryos zeigten, daß am 18. Tag des fetalen Lebens sich innerhalb weniger Stunden die Leydig'schen Zwischenzellen differenzieren, was mit dem gleichzeitigen Erscheinen von LH/HCG-Rezeptoren und Te-

stosteronsynthese einhergeht. Der Grund für den Beginn der Leydigzellentwicklung ist noch ungeklärt, jedoch besteht die Möglichkeit, daß dies unter dem Einfluß von Gonadotropinen geschieht. Bis zum 60. Lebens- tag der Ratte nimmt die Bindungskapazität für ^{125}Jod - HCG des Hodens zu, begleitet vom Anstieg des Serumtestosteronspiegels und der Leydigzellzahl. Die Bindungskapazität der einzelnen Zelle ändert sich vom 30. Lebenstag an nicht mehr. Um den 10. Tag ist die Bindungskapazität der Zelle um das 5 - 6 fache höher. Sowohl Testosteron- als auch LH-Serumkonzentrationen sind zu diesem Zeitpunkt erhöht. Die biologische Signifikanz hierfür ist noch nicht geklärt (Pahnke, Leidenberger, Künzig 1975). Ketelslegers, Hsueh, Hetzel, Catt (1976) fanden, daß bei der unreifen männlichen Ratte die LH-Rezeptorzahl pro Hoden als Folge erhöhter Serum-FSH-Konzentration und FSH-Rezeptorzahl im Hoden, vom 15. Lebenstag bis etwa zum 50. Tag ansteigt. Hypophysectomie sowie Kryptorchismus gehen nicht mit dem Verlust der Bindungsaktivität einher (Frowein & Engel 1975).

1.3. Der Radioligandrezeptortest

1.3.1. Entwicklung von Rezeptortests

Die spezifische Bindung eines Hormons an seinen Rezeptor diente seit der ersten Beschreibung eines Radiorezeptortests für ACTH durch Lefkowitz, Roth, Pastan (1970) als Grundlage zur quantitativen Hormonbestimmung. Die Vorzüge des Radioligandrezeptortests und mögliche Anwendungsbereiche beschreiben Reichert, Leidenberger, Trowbridge (1973) anhand eines LH-Tests: Die hohe Affinität des Hormons zu seinem Rezeptor ermöglichte die Entwick-

lung eines empfindlichen, hochspezifischen und präzisen in vitro-Biotests ohne die Nachteile, die der in vivo-Biotest mit seiner mangelnden Genauigkeit und Empfindlichkeit mit sich bringt. Neben der Messung von LH aus Hypophysen und Potenzvergleichen verschiedener Hormonpräparate, sowie zur Bewertung des Reinheitsgrades von "Subunit"-Präparationen, kann der Rezeptortest heute auch zur LH-Bestimmung in Urin und Blut des Menschen verwendet werden. Der Rezeptortest hat sich als wertvolles analytisches Hilfsmittel zur quantitativen Bestimmung vieler Hormone bewährt. So wurden Tests für Östrogene (Korenman, Perrin, McCallum 1969), FSH (Means & Vaitukaitis 1972, Reichert, Ramsey, Carter 1975, Cheng 1975), Prolaktin (Shiu & Friesen 1973) und ACTH (Lefkowitz et al. 1970) entwickelt.

1.3.2. Rezeptorquellen

Catt, Dufau, Tsuruhara (1971) verwendeten zu Beginn ihrer LH/HCG-Rezeptorstudien unfractionierte Zwischenzell-suspensionen und später die 1500xg-Fraktion des Homogenats von Rattenhoden (Catt, Dufau, Tsuruhara 1972). Das gesamte Hodenhomogenat von Ratten diente Leidenberger & Reichert (1972a) für den Rezeptortest. Auch Hodenhomogenat vom Schwein fand als Rezeptorquelle Anwendung (Tomoda, Miwa, Ishizuka 1975). Lee & Ryan (1973a) arbeiten mit der 2000xg-Fraktion aus dem Homogenat luteinisierten Rattenovarien.

1.3.3. Prinzip des Rezeptortests

Um die Bindung unbekannter Mengen Hormon an den Rezeptor quantitativ bestimmen zu können, nutzt man die Tatsache,

daß die Bindung von radioaktiv markiertem Hormon durch sogenanntes kaltes, nicht markiertes Hormon kompetitiv gehemmt wird. Die Trennung von gebundenem und freiem Hormon erfolgt im allgemeinen durch Zentrifugation, ist aber auch durch Filtrieren möglich (Lee & Ryan 1972). Die spezifische Bindung des Hormons ist eine Funktion der Hormonkonzentration und steigt mit zunehmender Konzentration bis zu einem Grenzwert, der Sättigung. Dagegen nimmt die unspezifische Bindung (die Bindung von radioaktiv markiertem Hormon, die auch durch exzessive Mengen von kaltem Hormon nicht mehr vom Rezeptor verdrängbar ist) proportional der Hormonkonzentration zu. Der Bindungsvorgang wird beeinflußt von der Temperatur, dem pH-Wert und der Ionenstärke des Inkubationsmediums in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Reichert, Leidenberger, Trowbridge 1973).

Kinetikstudien zeigten die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten von der Inkubationstemperatur. Sowohl Assoziations- (K_1) als auch Dissoziations- (K_2) geschwindigkeitskonstante sind bei 37°C höher als bei 24°C (Catt, Tsuruhara, Dufau 1972). Die Assoziationsgeschwindigkeit ist unabhängig von der Hormonkonzentration (Lee & Ryan 1973b), Ketelslegers, Knott, Catt 1975). Ketelslegers et al. (1975) bestimmten die Werte für K_1 und K_2 unter Berücksichtigung der während der Inkubation auftretenden möglichen Inaktivierung oder Schädigung von Hormon und Rezeptor.*

*Mittelwerte für K_1 bei 24°C $4,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$
 bei 37°C $11,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$

K_2 (1. Phase)
 bei 24°C $1.7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$
 bei 37°C $4.6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$

Diese Werte für die Bindung von HCG an Rattenhodenhomogenat unterscheiden sich von denen anderer Autoren (Gospodarowicz 1973, Lee & Ryan 1973b). Übereinstimmend fanden Lee & Ryan (1973b) und Ketelslegers et al. (1975) einen zweiphasigen Dissoziationsverlauf. Der erste schnelle Dissoziationsschritt war jedoch nach längerer Präinkubationszeit nicht mehr zu beobachten, was möglicherweise durch die Bindung des Hormons an mehreren Stellen des Rezeptormoleküls zu erklären ist. Gleichgewichtsstudien weisen auf die Homogenität der Bindungsstellen im Rattenhoden hin (Ketelslegers et al. 1975). Andere Autoren halten jedoch zwei Arten von LH-Rezeptoren für möglich: eine mit hoher und eine mit geringer Affinität, bzw. eine, die die Steroidgenese vermittelt und eine, die die cAMP-Anreicherung veranlaßt (Moyle & Ramachandran 1973, zit. aus Marsh 1976).

1.4. Der Rezeptortest zur Messung von LH und HCG in Serum

Die Anwendung des Radioligandrezeptortests zur Bestimmung von Serumgonadotropinen wird durch den störenden Einfluß unbekannter Serumfaktoren auf die spezifische Hormonbindung erschwert (Schams & Schindlmayr 1973, Reichert, Leidenberger, Trowbridge 1973, Catt, Dufau, Vaitukaitis 1975). Lee & Ryan (1975) konnten mit einem hochempfindlichen Testsystem HCG schwangerer Frauen und mittzyklische LH-Gipfel in geringen Serumvolumina messen. Bei erhöhtem Serumvolumen machte sich jedoch der unspezifische Einfluß des Serums bemerkbar. Der Rezeptortest wurde bereits erfolgreich zur frühzeitigen Schwangerschaftsdiagnose über die HCG-Bestimmung in Serum herangezogen (Levin, Rao, Yussman 1975, Landesman & Saxena 1976). Im Ge-

gensatz zu den übrigen Arbeitsgruppen war der unspezifische Serumeffekt bei diesen Autoren nicht von störender Bedeutung. Erst nach starker Verdünnung oder nach Extraktion des Serums gelang Tomoda et al. (1975) die Messung von hLH und HCG. Eine einfache Methode zur Ausschaltung der unspezifischen Faktoren in menschlichem Serum mittels einer Alkoholextraktion entwickelten Leidenberger, Willaschek, Pahnke, Reichert (1976).

1.5. Vergleich verschiedener Testsysteme zur LH-Bestimmung

Zur Messung der LH-Aktivität in Serum werden allgemein zwei verschiedene Testsysteme verwendet: Biotests und Immunotests. Zusätzlich wurden in den letzten Jahren verschiedene in-vitro-Biotestmethoden entwickelt. Für die Bestimmung der biologischen LH-Aktivität in einem in-vivo-System erwiesen sich der Ovaraskorbinsäuretest (OAA) (Karg 1957, Parlow 1958) und der Gewichtstest der ventralen Prostata (VPW) (Greep, van Dyke, Chow 1941, Diczfalusy 1954) als brauchbarste Methoden. Die radioimmunologische Methode erfolgt nach dem Prinzip, das erstmalig von Yalow & Berson (1959) für Insulin beschrieben wurde. Midgley & Ram (1965) und Franchimont (1966) entwickelten Radioimmunotests für humanes LH, wenige Jahre später konnte mit Hilfe des radioimmunologischen Testsystems auch bovines LH gemessen werden (Schams & Karg 1969 Niswender, Reichert, Midgley, Nalbandov 1969, Snook, Saatman, Hansel 1971). Zu den in-vitro-Biotest-Verfahren gehört der Radioligandenztest, sowie die Steroidproduktionstests. Hierbei wird die Fähigkeit von LH/HCG ausgenutzt, nach der Bindung an die Rezeptoren in Hoden oder Ovar die Synthese von Testosteron (Dufau, Catt, Tsuruhara 1971, Dufau, Catt, Tsuruhara 1972b, Tsuruhara, Dufau, Hick-

man, Catt 1972, Moyle & Ramachandran 1973, van Damme, Robertson, Diczfalusy 1974) bzw. Progesteron (Graesslin, Leidenberger, Künzig, Döll, Glisman 1975, Watson 1972) zu veranlassen. Die verschiedenen Meßmethoden lassen untereinander mehr oder weniger deutliche Unterschiede in den Ergebnissen erkennen, auch wenn identische Standardpräparate angewandt werden. Diese Unterschiede können ihre Ursache darin haben, daß die Bindungsstellen des Hormonmoleküls für den Antikörper einerseits und für den Rezeptor der Erfolgszellen andererseits voneinander getrennt sind (Imura, Sparks, Grodsky, Forsham 1965, Albert, Rosemberg, Ross, Paulsen, Ryan 1968). Weiterhin wirkt sich eine eventuelle Metabolisierung und Clearance, charakterisiert durch die Halbwertszeit des Hormons nur im in-vivo-Biotest aus. Die Entfernung der Sialinsäure von HCG, die mit einer Verkürzung der Halbwertszeit verbunden ist, führt im in-vivo-Biotest zu einer Reduzierung der Aktivität, ein Effekt, der im VPW-Test stärker ausgeprägt ist, als im OAAD-Test. Im Radioimmuno- und Rezeptortest ist der Einfluß der Sialinsäure ohne Bedeutung (Van Hall, Vaitukaitis, Ross, Hickman, Ashwell 1971). Die Aktivität des desialinisierten Hormons ist im Testosteronproduktionstest um 50 % erniedrigt. Rekombinationsversuche mit intakten und desialinisierten Subunits zeigten, daß der Sialinsäuregehalt der α -Subunits, obwohl geringer als der der β -Subunits, einen größeren Einfluß auf die Testosteronproduktion hat (Hilgenfeldt, Merz, Brossmer 1976). Vergleichsweise mittels Radioimmunotest und OAAD-Test gewonnene LH-Werte im Rinder Serum zeigten zwar bezüglich der physiologischen Zuordnung ähnliche Tendenzen, die mit dem OAAD-Test ermittelten Werte sind jedoch um das 3 bis 10 fache höher als die radioimmunologisch bestimmten (Karg, Schams, Böhm 1969).

Faiman, Ryan, Albert (1968) zeigten eine gute Übereinstimmung der LH-Werte aus Urinextrakten im Radioimmunotest und

im VPW-Test nur, wenn das Standardhormon auch aus Urin-extrakt gewonnen wurde.

Die mit dem Radioligand-Rezeptortest ermittelten LH-Werte in Human-Serum übertreffen die radioimmunologischen. Leidenberger et al. (1976) fanden das Verhältnis von RRT- zu RIT-Werten schwankend von 2 - 20. Lee & Ryan (1975) erhielten etwa 2mal höhere RRT-Werte. Tomoda et al. (1975) verglichen das RRT/RIT-Verhältnis von Urin- und Serum-HCG während der Gravidität, und erhielten unterschiedliche Ergebnisse entsprechend der Herkunft des Hormons. Dies wird durch mögliche Unterschiede in der chemischen Struktur des Hormons erklärt.

Die von Graesslin et al. (1975) mit dem Radioligand-Rezeptortest und einem Progesteron-Produktionstest gemessenen hLH-Werte im Serum stimmen in ihren Absolutwerten gut überein. Ein von Dufau, Pock, Neubauer, Catt (1976) entwickelter, hochempfindlicher Testosteron-Produktionstest korreliert eng mit den RRT-Werten in Human-serum, im Vergleich zum in-vivo-Biotest sind die Werte fast 10mal niedriger, jedoch etwa 2mal höher als im Radioimmunotest (Dufau, Mendelson, Catt 1974). Höhere Werte als im RIT fanden auch Qazi et al. (1974) mit einem Testosteron-Produktionstest für Plasma hLH mit einem Bio/Immuno-Verhältnis von 2 - 14.

2. METHODISCHER TEIL

Der Test wurde zunächst in Anlehnung an die von Catt et al. (1971), Leidenberger et al. (1972a), und Schindlmayr (1973) beschriebenen Methoden aufgebaut.

2.1. Rezeptorgewinnung

Als Versuchstiere dienten männliche Albinoratten mit einem Körpergewicht von 250 - 300 g. Die Tiere wurden unter Chloroform-Narkose kastriert und die Hoden in eiskühlem 0,05 m Phosphatpuffer pH 7,5 aufgefangen. Nach Entfernen der Tunica albuginea und größerer Blutgefäße wurden die Hoden gewogen. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte zu Beginn der Versuche im "Potter" (Glaszylinder mit rotierendem, genau eingepaßtem Teflonstopfen; der Zylinder hängt in einem Behälter mit Kühlwasser; Fa. Braun, Melsungen). Bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 1500 U/min wurde jeder Hoden in 5 ml Puffer 20 Sekunden homogenisiert, anschließend durch eine dünne Glaswollschicht filtriert, um eventuell verbliebene größere Bindegewebsteile zu entfernen. Für spätere Versuche wurde eine weniger intensive Homogenisierungsmethode angewendet. Die Hoden wurden im "Bühler" (Fa. Edmund Bühler, Tübingen; Homogenisierungs-Gerät, in dem das Gewebe mittels schnell rotierender Messer in einem Glaszylinder zerkleinert wird) 30 Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 1500 xg bei 4°C 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehebert, das Sediment gewogen und mit Phosphatpuffer zu einer Konzentration von 20 mg/ml resuspendiert. Diese Suspension hatte einen Proteingehalt von 800 - 1000 µg/ml. Die Bestimmung wurde nach der Methode von Lowry, Rosebrough, Farr (1951) durchgeführt, einer Farb-

reaktion, die über zwei getrennte Schritte abläuft, zunächst einer Reaktion von Protein mit Kupfer in alkalischem Milieu und anschließender Reduktion von Folin-Reagens.

2.2. Rezeptorkonservierung

Da nach Schindlmayr (1973) die Reproduzierbarkeit des Tests sowohl durch Markierungsunterschiede als auch durch individuelle Rezeptorunterschiede beeinflusst wird, wurde ein Pool aus Rezeptormaterial einer größeren Anzahl von Ratten angelegt. Aliquots dieser Rezeptorsuspension wurden im Tiefgefrierschrank bei ca. -80°C aufbewahrt. So konnte über einen längeren Zeitraum identisches Rezeptormaterial verwendet werden. Nach 6-monatiger Aufbewahrung konnte noch kein Qualitätsverlust festgestellt werden. Zweimaliges Auftauen führte lediglich zu einem geringen Verlust der absoluten Bindung.

2.3. Markierung von HCG

Zur radioaktiven Markierung wurde HCG anstelle von LH verwendet, da markiertes LH eine geringe Bindung an den Rezeptor zeigte (Catt & Dufau 1973). HCG verhält sich in seiner biologischen Wirkungsweise wie LH. Zunächst wurde die von Schindlmayr (1973) angewendete Markierungsmethode mit Chloramin T (modifiziert nach Hunter & Greenwood 1963) übernommen. Die Markierung wurde mit 1 mCi Na ^{125}J (spez. Akt.: 8 - 15 Ci $^{125}\text{J}/\text{mg}$, Fa. Hoechst, Frankfurt) in 50 μl 0,5 m Phosphatpuffer pH 7,5, 5 μg HCG in 50 μl 0,5 m Phosphatpuffer pH 7,5 und 10 μg Chloramin-T in 25 μl 0,05 m Phosphatpuffer pH 7,5 durchgeführt. Nach einer Oxidationszeit von 20 Sekunden wurde die Reaktion beendet durch

Zugabe von 50 µg Na-Metabisulfit in 300 µl 0,05 m Phosphatpuffer pH 7,5.

Weiterhin wurde mit einer enzymatischen Methode der Jodierung mit Laktoperoxidase (Holohan et al. 1973) gearbeitet. Die Reaktion wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Zu 1/2 mCi Na ^{125}J in 50 µl 0,5 m Phosphatpuffer pH 7,5 wurden 5 µg hochgereinigtes HCG (13000 IE/mg 2nd Int. Standard HCG, Fa. Serono, Rom, Italien) in 50 µl 0,5 m Phosphatpuffer pH 7,5 gegeben. Dann wurden 2,5 µg frisch verdünnte Laktoperoxidase (Boehringer, Mannheim) in 10 µl Essigsäure-Acetatpuffer 0,05 m pH 5.0 zugefügt. Die Reaktion wurde durch zweimalige Zugabe von jeweils 150 ng Wasserstoffsuperoxid in 10 µl Aqua dest. im Abstand von 5 Minuten in Gang gesetzt. Nach 15 Minuten Schüttelzeit war die Reaktion beendet. Die Trennung von markiertem Hormon und freiem ^{125}J erfolgte mittels Säulenchromatographie über Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) Füllhöhe: 20 cm, Gel-Volumen: 30 ml. Das Sephadex G-50-Gel wurde mit 0.05 m Phosphatpuffer equilibriert und mit Human-Serum-Albumin vorbehandelt. Zur Elution wurde 0,07 m Veronalpuffer pH 8,6 verwendet. Der erste "Peak" mit dem markierten HCG wurde milliliterweise in silikonisierten Gläsern mit einer Vorlage von 5 mg Humanalbumin in 0.1 ml aufgefangen. In einem zweiten Peak erschien das freie ^{125}J . Das markierte Hormon wurde bei -20°C aufbewahrt.

Die zweite Reinigung wurde am Tag der Inkubation durchgeführt. Sie erfolgte über eine Zellulose-Säule (Type HBS, Serva, Heidelberg). Als Startpuffer, in dem auch die Zellulose gequollen wurde, diente 0,01 m Phosphatpuffer pH 7,5. Der damit eluierte erste Peak enthielt geschädigte Markierungsprodukte, sogenannter "Damage", und wurde verworfen. Die Elution des ungeschädigten ^{125}J -HCG erfolgte mit Pferdeserum, das 1 : 4 mit 0,5 m

Phosphatpuffer pH 7,5 verdünnt war.

2.4. Inkubation und Meßtechnik

In kleine Plastikinkubationsröhrchen (10 mm x 65 mm) wurden 0,3 ml Standardhormon in 0,05 m Phosphatpuffer pH 7,5 mit einem Zusatz von 18⁰/₁₀₀ EDTA und 0,5⁰/₁₀₀ Human-Serum-Albumin bzw. die unbekannte Serumprobe pipettiert. Hierzu kamen 0,5 ml der Rezeptorsuspension, 0,1 ml eines Extraktes aus LH-armem Bullenserum (Erläuterungen hierzu sind unter 2.8.2. nachzulesen) und 200 KIE (0,02 ml) Trasylol, ein Proteaseninhibitor. Im Wasserbad bei 37°C wurden die Proben unter Schütteln 30 Minuten vorinkubiert. Nach Zugabe von 0.1 ml ¹²⁵Jod-HCG (etwa 20 000 cpm) wurde weitere 2 Stunden unter denselben Bedingungen inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben 20 Minuten bei 1500xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt. Resttropfen wurden mit Zellstoff ausgewischt. Die im Präzipitat verbliebene Radioaktivität, die das an den Rezeptor gebundene ¹²⁵J-HCG darstellt, wurde im Scintillationszähler (Gamma-Counter LKB Wallac) gezählt. Aus dieser Radioaktivität wurde die absolute Bindung, sowie die relative Bindung unbekannter Serumproben ermittelt und anhand eines Vergleichsstandards ausgewertet. In Kapitel 2.9. "Standardkurve" wird hierüber ausführlich berichtet.

2.5. Tastversuche zur unmittelbaren Anwendung des Rezeptortests für LH im Rinderblut

Die Bestimmung von LH im Rinderplasma bzw. -serum wurde bisher durch das Auftreten eines unbekannten, unspezifischen

Faktors gestört. Zum einen wurde durch Hemmung der absoluten Bindung von markiertem Hormon an den Rezeptor eine erhöhte LH-Aktivität vorgetäuscht, zum anderen wurde das markierte Hormon durch zugesetztes kaltes Hormon ungenügend vom Rezeptor verdrängt. Hieraus ergaben sich sehr schlechte Wiederfindungsergebnisse und fehlende Parallelität von Serum-Verdünnungsreihen zur Standardkurve. (Siehe Abb. 2)

Radioimmunologisch gemessene Unterschiede endogener LH-Konzentrationen im Serum konnten mit dem Rezeptortest nicht entsprechend nachgewiesen werden. Die Natur dieser Interferenz ist noch nicht geklärt. Auswege wären entweder den störenden Faktor im Serum zu belassen und durch rechnerische Maßnahmen zu eliminieren, oder ihn aus dem Serum zu entfernen. Ersteres wäre durch Zugabe von LH-freiem bzw. -armem Serum zu jedem Teströhrchen möglich. Dieser Weg erwies sich nach Schindlmayr (1973) und Schams & Schindlmayr (1973) als nicht gangbar, da sich der störende Einfluß nicht in jedem Serum gleich stark auswirkt. Durch Verdünnung des Serums konnte die Störwirkung weitgehend ausgeschaltet werden, wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, die endogenen LH-Konzentrationen lagen dann jedoch nicht mehr im Meßbereich.

2.6. Fällungsmethoden

Mit den folgenden Versuchen sollten die störenden Faktoren aus dem Serum entfernt werden.

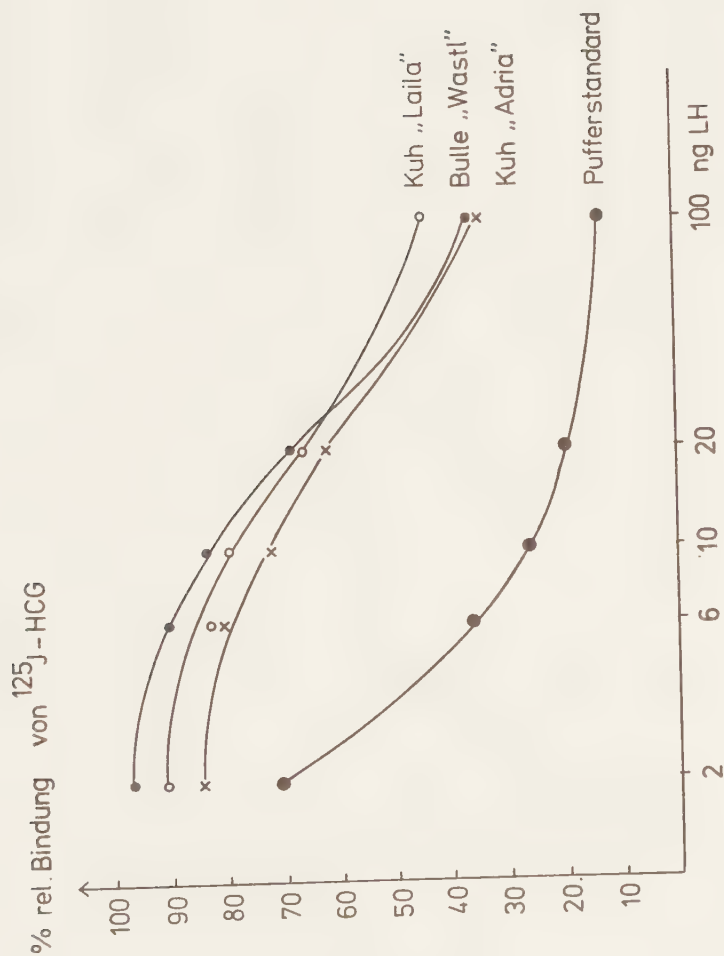


Abb. 2 Einfluß von Serum auf die Standardkurve im Vergleich zum Pufferstandard

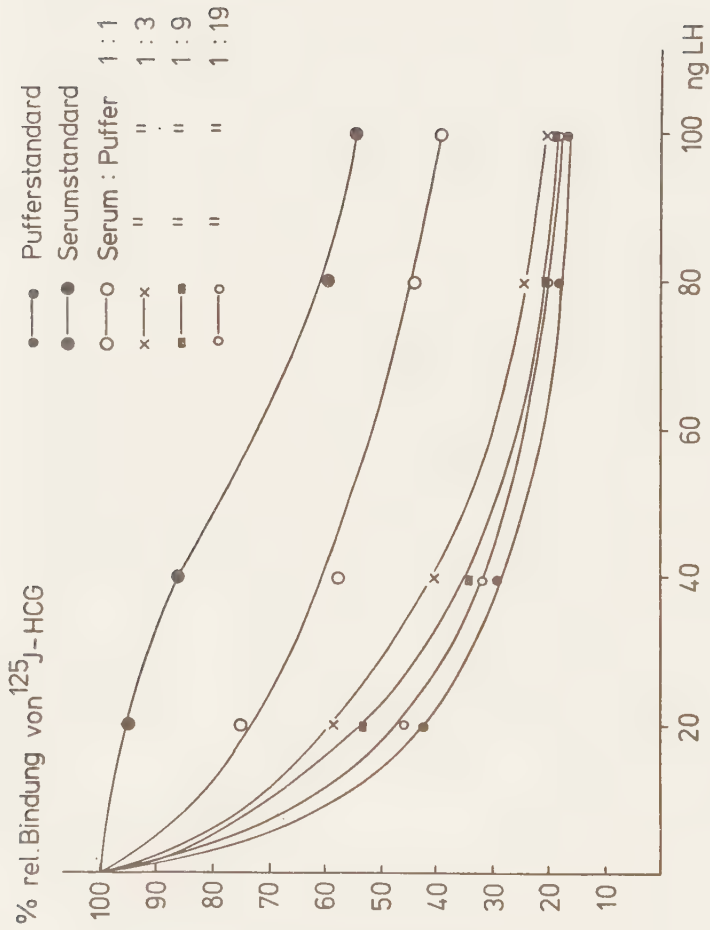


Abb. 3 Vergleich von Standardkurven mit zunehmender Serumverdünnung

2.6.1. Alkoholfällung

Die von Leidenberger et al. (1976) für Humanserum erfolgreich angewandte Methode zur Beseitigung der unspezifischen Faktoren durch Präzipitation mit Alkohol, wurde auch mit Rinder Serum versucht. Dem Rinder Serum wurde absoluter Alkohol bis zu einer Gesamtkonzentration von 8 % zugesetzt, 1 Stunde bei 0°C stehen gelassen, und das so entstandene sehr geringe Präzipitat (Cohn-Fraktion I Fibrinogen) durch Zentrifugieren entfernt. Im Gegensatz zu den mit Humanserum erzielten Ergebnissen konnte mit dem so behandelten Serum keine Verbesserung der Parallelität von Verdünnungsreihen zur Standardkurve erreicht werden. Der Meßbereich von LH im Serum konnte zwar erniedrigt werden, die Wiederfindung von dem Serum zugesetztem LH bewegte sich jedoch zwischen 10 und 50 %. Eine Erhöhung der Alkoholkonzentration zur Ausfällung weiterer Plasmapbestandteile führte zu gleichzeitiger Präzipitation des LH.

2.6.2. Ammoniumsulfatfällung

Die Präzipitation der Serumproteine mit Ammoniumsulfatlösung hat sich nach Leidenberger et al. (1976) ebenfalls zur Eliminierung der Störfaktoren als geeignet erwiesen. So wurde Serum bzw. Plasma bis zu einer 1,75 molaren Konzentration mit Ammoniumsulfatlösung versetzt. Nach einstündigem Stehenlassen bei 0°C wurde das Präzipitat nach Zentrifugieren gewonnen, in Phosphatpuffer resuspendiert, und nach 24 Stunden Dialysierzeit gegen Aqua dest. lyophilisiert. Hinsichtlich der Verbesserung der Gültigkeitskriterien konnte mit Rinder Serum kein Erfolg erzielt werden.

Nach einer Methode von Gospodarowicz & Papkoff (1967) wurde Plasma mit 0,5 m Metaphosphorsäure auf pH 3,0 gebracht, das Präzipitat nach Zentrifugieren verworfen. Die Wiederfindung von zugesetztem radioaktiv-markiertem LH im Überstand überstieg jedoch nie 25 %.

Weitere Präzipitationsversuche mit alkoholischer Ammoniumsulfatlösung mit anschließender Alkoholfällung, wie sie auch zur Reinigung von Proteohormonen aus Hypophysen angewendet werden, waren ebenfalls erfolglos.

2.7. Gewinnung serumspezifischer Blindwerte nach Zerstörung der LH-Aktivität

Wasserstoffsuperoxid (H_2O_2) zerstört die biologische Wirkung von LH. Dieser Effekt sollte in dem Versuch, für jede Serumprobe ihren individuellen Blindwert zu bestimmen, ausgenutzt werden. Den Serumproben wurde H_2O_2 bis zu einer 1 molaren Konzentration im Serum zugesetzt (Methode nach Reichert 1961), nach einstündiger Inkubationszeit 24 Stunden gegen Aqua dest. dialysiert und anschließend lyophilisiert. Es zeigte sich bei diesen Versuchen, daß allein durch Dialysieren die hohen Meßwerte beträchtlich gesenkt werden konnten. Diese Maßnahme allein genügte allerdings nicht zur Beseitigung der störenden Faktoren, wie unzureichende Parallelität und Wiederfindung von LH-Zusätzen zeigten.

Die Differenz zwischen den Meßwerten des dialysierten Serums als Blindwert und dem H_2O_2 -behandelten Serum, d.h. von LH befreitem Serum, sollte das wahre LH erkennen lassen. Die Ergebnisse der Wiederfindung von LH-Zusätzen waren nicht konstant und überschritten nie 50 %. Die Parallelität der Serumverdünnungsreihen

zur Standardkurve waren ebenfalls so schlecht, daß mit dieser Methode nicht gearbeitet werden konnte.

Es wurde weiterhin versucht, das endogene LH an spezifische LH-Antikörper zu binden und zu präzipitieren. Dies führte jedoch ebenfalls nicht zu dem Ziel, den störenden Faktor zu eliminieren.

2.8. Abtrennung von Serum-LH mittels Säulenchromatographie

2.8.1. Anionenaustauscher

Der zunächst verwendete Anionenaustauscher Diäthylaminoäthyl (DEAE)-Zellulose (Serva, Heidelberg) ergab nicht den gewünschten Erfolg der Trennung von LH von den übrigen Serumproteinen. Auf die Säule aufgetragenes Serum mit Zusatz von radioaktiv-markiertem LH wurde zuerst mit 0,1 M Glycinpuffer pH 9,5 eluiert. Mit dem Startpuffer erschien der Hauptproteinanteil des Serums gleichzeitig mit dem größten Teil des aufgetragenen ¹²⁵J-LH.

2.8.2. Kationenaustauscher

Als Austauschgel diente Carboxymethyl (CM)-Sephadex C-50 (Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Schweden), das in einem Volumen von 15 ml in Glaschromatographierohre (Ø 13 mm) gefüllt wurde. Das Austauschgel wurde im Startpuffer gequollen, mit dem auch das zu reinigende Serum zu gleichen Teilen verdünnt wurde. Das Auftragsvolumen von Serum war 2 ml. Zur Elution wurden folgende Puffer verwendet:

1.) Acetatpuffer pH 5,4

Elutionsvolumen: 35 ml

2.) Phosphatpuffer pH 7,0

Elutionsvolumen: 40 ml

3.) Dikaliumhydrogenphosphat 0,2 m

Elutionsvolumen: 25 ml

zu 1.) Acetatpuffer pH 5,4

Essigsäure (Eisessig) 100%	1 m	120 ml
Natronlauge	1 m	100 ml
Aqua dest.	ad	1000 ml

zu 2.) Phosphatpuffer pH 7,0

KH_2PO_4 (prim. Kaliumphosphat)	1 m	20 ml
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ (sek. Kaliumphosphat)	1 m	30 ml
Aqua dest.	ad	1000 ml

zu 3.) Phosphatpuffer 0,2 m

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$		45,6 g
Aqua dest.	ad	1000 ml

Aus Abb. 4 ist der Elutionsverlauf der Serumproteine, gemessen mit dem Spektralphotometer (Beckman) bei 278 nm, und des $^{125}\text{J-LH}$ zu erkennen. Sowohl mit dem Startpuffer als auch mit dem folgenden Puffer wurde ein Großteil der Proteine eluiert, wobei das LH in der Säule gebunden blieb bzw. nur zu einem kleinen Teil eluiert wurde. Mit dem letzten Puffer erschien das LH, der Proteinanteil war nur noch gering. Das gewonnene Eluat des dritten Puffers, eine klare, farblose Flüssigkeit, wurde in einen Dialysierschlauch (Serva, Heidelberg, Visking Dialysierschlauch, Porendurchmesser 15 - 20 Å, Ausschlußgrenze

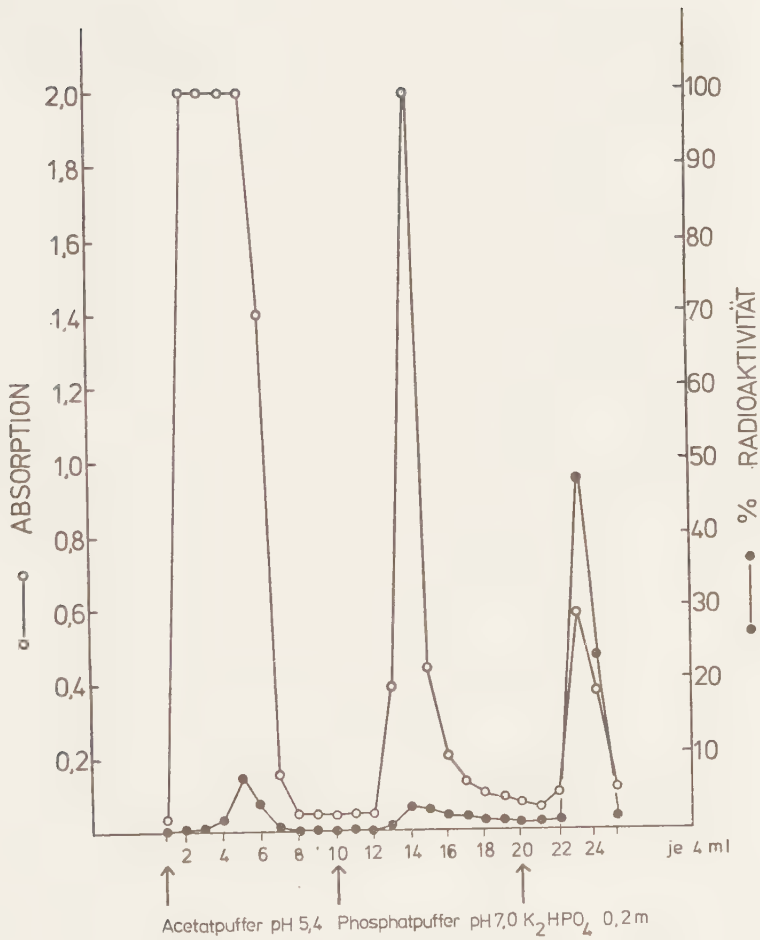


Abb 4 Verlauf der Serumproteine (Absorption gemessen bei 278 nm) und des ^{125}J -LH nach Elution über eine CM-Sephadex C-50-Säule

bei 10 000 - 20 000 Daltons) gefüllt und 24 Stunden gegen Aqua dest. dialysiert. Dieser Vorgang war erforderlich, da die Salz-Konzentration im letzten Puffer die Bindung von Hormon an den Rezeptor vollständig verhinderte.

Zur Volumeneinengung wurde anschließend lyophilisiert und das Protein mit 0,05 m Phosphatpuffer pH 7,5 auf das Ausgangsvolumen bzw. ein anderes gewünschtes Volumen gebracht. Dieser "Serumextrakt" wurde im Rezeptortest verwendet. Mit dieser Reinigungsmethode gelang es erstmalig, endogene LH-Konzentrationen im Rinderserum nachzuweisen.

Bei der Überprüfung der Wiederfindung von dem Serum zugesetztem LH zeigte sich jedoch, daß nach der erforderlichen Korrektur (s.u.) der Meßwerte deutlich erhöhte LH-Mengen gefunden wurden. (Siehe Tabelle 1). Erst nachdem sowohl der Standardkurve als auch den zu messenden Proben ein Zusatz eines über die CM-Sephadex-C 50-Säule gereinigten Extraktes aus LH-armem Bullenserum zugegeben wurde, waren die Wiederfindungsergebnisse zufriedenstellend. Die in Tabelle 2 angegebenen Wiederfindungswerte wurden entsprechend dem bei der Serumreinigung auftretenden Verlust korrigiert.

Tabelle 1

LH-Zusatz ng/Ansatz	Testanzahl n	% Wiederfindung		V_k %
		$\bar{x}$	$\pm s$	
5	6	124,5	$\pm 27,4$	22
10	8	129	± 20	15,5
20	7	137	± 40	29
40	3	173	± 77	44,6

Tabelle 2

LH-Zusatz ng/Ansatz	Testanzahl n	% Wiederfindung		V_k %
		$\bar{x}$	$\pm s$	
2	3	101	$\pm 10,6$	10,5
5	9	101	$\pm 14,7$	14,6
10	8	100	± 13	12,9
20	8	103	± 17	16,7
40	6	102,5	± 20	19,5

Zunächst wurde hierfür der sich aus den Versuchen mit ^{125}J -LH gefundene Wert von 23 % verwendet. Mit diesem Korrekturwert ergab sich eine erhöhte Wiederfindung von durchschnittlich 105 %, sodaß weiterhin die Werte nur entsprechend einem Verlust von 18 % korrigiert wurden, in der Annahme, daß sich markiertes und nicht markiertes LH bei der Säulenreinigung nicht vollständig gleich verhalten.

2.9. Standardkurve

Die Versuche wurden anhand einer im folgenden beschriebenen Standardkurve ausgewertet, (siehe Abb. 5): Die absolute Bindung drückt aus, wieviel Prozent des zugegebenen markierten Hormons vom Rezeptor gebunden werden. Sie betrug durchschnittlich $8,5 \pm 1,5$ % ($n = 15$). Bei der relativen Bindung gilt der Blindwert der Standardkurve als 100 % Bindung.

Der 50 %-Intercept-Wert gibt an, bei wieviel ng nicht-markierten Hormons eine relative Bindung von 50 % erreicht wird. Er lag bei 10 Versuchen unter gleichen Bedingungen bei $3,74 \pm 0,5$ ng (Variationskoeffizient (V_k) = 14,5 %).

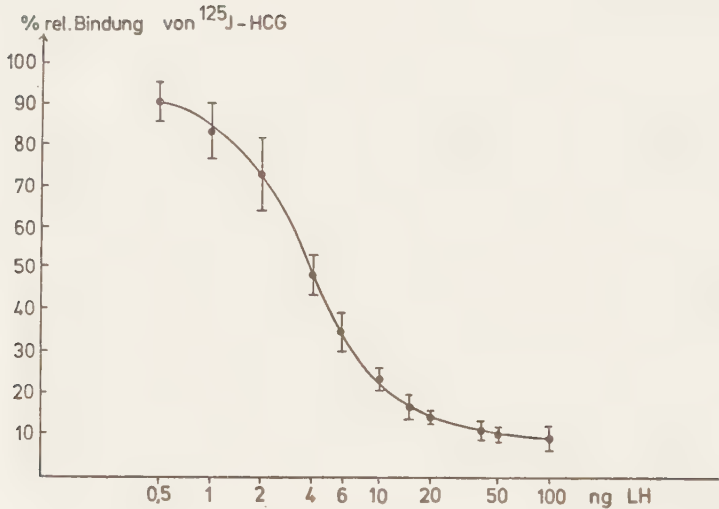


Abb. 5 LH-Standardkurve (B-LH-DS-A) mit Standardabweichungen

Als Standardhormon wurde das NIH-LH-Präparat B_8 (biol. Aktivität $1,03 \times \text{NIH-LH-S}_1$), sowie ein im hiesigen Institut gereinigtes bovines LH-Präparat, B-LH-DS-A, von etwa gleicher Aktivität, verwendet. Der Meßbereich der Standardkurve lag zwischen 0,5 und 50 ng LH (B-LH-DS-A). Bei den gemessenen Werten wurde der Leerwert, das heißt die an die Gefäßwand adsorbierte Radioaktivität, sowie die unspezifische Bindung berücksichtigt. Die unspezifische Bindung, die auch bei Überschuß von 1000 ng kaltem Hormon nicht verdrängt werden konnte, betrug durchschnittlich 4 %.

2.10. Spezifität

Untersuchungen von Leidenberger & Reichert (1972), Catt et al. (1971) und Schindlmayr (1973) zeigten, daß die Proteohormone FSH, GH, Prolaktin und TSH im Bereich physiologischer Serumkonzentrationen keine Kreuzreaktionen verursachen. Im cytohistochemischen Biotest (Kramer et al. 1976) wurde eine Interferenz festgestellt, wenn LH gemeinsam mit geringen Konzentrationen von FSH, sowie α - oder β -Untereinheiten von LH getestet wurde. Die Meßbarkeit von LH wurde deutlich unterdrückt. In eigenen Versuchen führte die Kombination von 15 ng LH mit 10 - 100 ng FSH oder α - bzw. β -Subunits von LH pro Inkubationsansatz zu keiner Änderung der LH-Meßbarkeit im Rezeptortest.

Abb. 6 zeigt, daß α -Subunits die Bindung von markiertem HCG nicht hemmen. β -Subunits wie auch FSH lassen in hoher Dosierung einen Kurvenabfall erkennen. Die Hormone HCG und PMSG zeigten, wie aus Abb. 7 ersichtlich ist, die erwartete gute Kreuzreaktion zum Standard-LH.

2.11. Identität zwischen endogenem LH und Standard-LH

Verdünnungsreihen des gereinigten Serums zeigten eine gute Parallelität zu exogenem LH in Form der Standardkurve. (Siehe Abb. 8) Dies ist ein Hinweis dafür, daß das im Serum gemessene Hormon mit dem Standard-LH identisch ist.

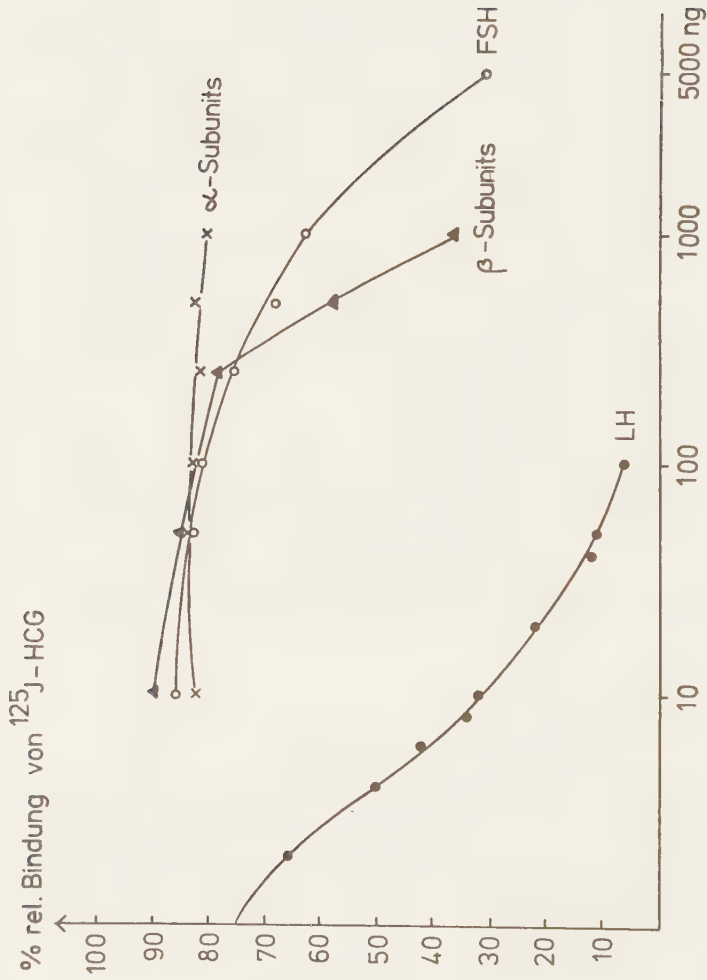


Abb. 6 Einfluß von LH α - und β -Subunits, sowie hochgereinigtem Schaf-FSH und Rinder-LH auf die Bindung von ^{125}J -HCG

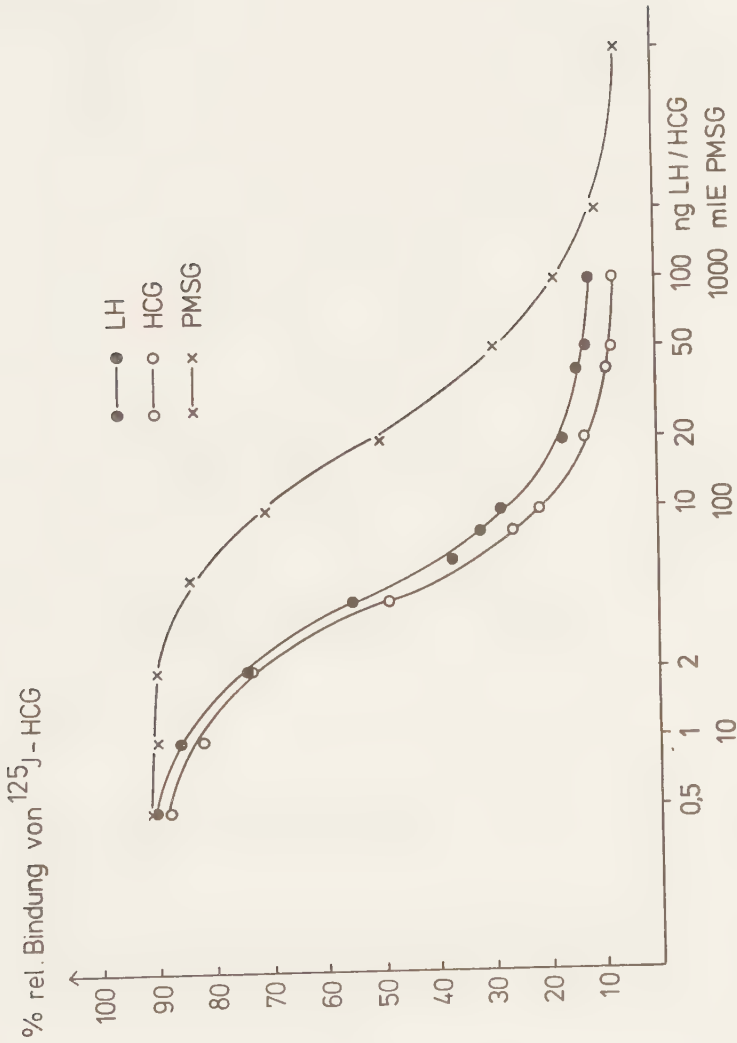


Abb. 7 Standardkurven von hochgereinigtem LH (B-LH-DS-A), HCG (13 000 IU/mg) und PMSG (10 000 IU/mg)

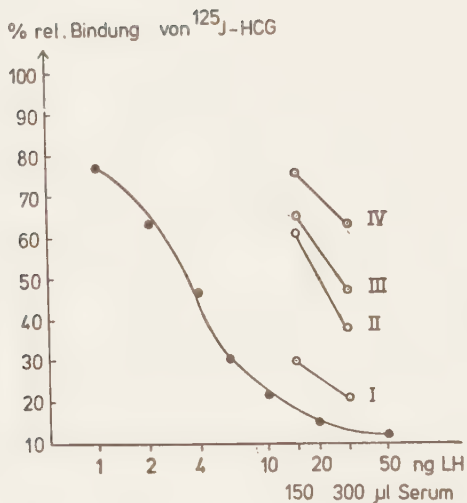


Abb. 8 Standardkurve ●—● und Verdünnungen von Serum ○—○ von vier verschiedenen weiblichen Rindern (I - IV)

2.12. Reproduzierbarkeit

2.12.1. Reproduzierbarkeit der Säulenreinigung über CM-Sephadex C-50

Als Gel-Volumen wurden 15 ml gewählt und 2 ml Serum aufgetragen. Für die Wiederfindungs- und Reproduzierbarkeitsversuche wurde Serum mit einem Zusatz von ^{125}J -LH aufgetragen.

Mit dem letzten Puffer (0,2 m K_2HPO_4) - (siehe auch Abb. 4) - wurden bei 24 Versuchen durchschnittlich $78 \pm 7 \%$

der aufgetragenen Radioaktivität, bei einem Variationskoeffizienten (V_k) von 9 %, wiedergefunden, wobei für die Versuche $^{125}\text{J-LH}$ aus verschiedenen Markierungsansätzen verwendet wurde. Innerhalb eines Versuchs mit gleicher Markierung betrug der durchschnittliche Variationskoeffizient nur 1,3 %.

Mit dem Startpuffer (Acetatpuffer pH 5,4) wurden durchschnittlich 10,7 % (7,1 % - 18 %) der Radioaktivität und mit dem zweiten Puffer (Phosphatpuffer pH 7,0) 10,8 % (6,4 % - 15,8 %) eluiert.

Wurden 20 ml CM-Sephadex C-50-Gel verwendet und 2 oder 3 ml Serum aufgetragen, oder 10 ml Gel und 1 ml Serum, so ergaben sich entsprechende Ergebnisse. Das größere Volumen von 2 ml Serum wurde aus arbeitstechnischen Gründen bevorzugt. Für 2 ml Serum war die Kapazität von 10 ml Gel nicht ausreichend, mit dem Startpuffer wurden bereits 32 % der Radioaktivität eluiert, sodaß nur durchschnittlich 60 % LH wiedergefunden wurden.

2.12.2. Reproduzierbarkeit des Rezeptortests

Bei 6-facher Bestimmung einer Serumprobe ($n = 5$) ergab sich eine "intra-assay"-Varianz von durchschnittlich 3,0 %. Bei den 3-fach Bestimmungen für die Standardkurve lag der durchschnittliche Variationskoeffizient bei 30 berechneten Proben (90 Werte) bei 3,6 %. Wurde das gleiche Serum über vier verschiedene Säulen gereinigt und anschließend die LH-Werte im gleichen Rezeptortest bestimmt, so ergab sich bei 9 Versuchen ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 9,4%. Dieser Wert setzt sich aus den Schwankungen innerhalb des Tests, sowie den Schwankungen aus der Säulenreini-

gung zusammen.

Die Variation, die zwischen den Tests besteht, wurde mit Hilfe von Kontrollseren ermittelt, die in größerer Menge über die Austauschsäulen gereinigt, anschließend in 1 ml-Aliquots tiefgefroren aufbewahrt, und in jedem Versuch mitgetestet wurden (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3

Kontrollserum	Testanzahl n	ng LH / 0,1 ml $\bar{x}$	$\pm s$	$V_k \%$
I	8	8,7	$\pm 0,87$	10
II	7	4,6	$\pm 0,66$	14
III	11	3,57	$\pm 0,48$	13,6
IV	9	0,73	$\pm 0,1$	14

Bei der wiederholten Testung von Kontrollseren mit unterschiedlichem LH-Gehalt ergab sich eine Reproduzierbarkeit von 10 - 14 %.

2.13. Versuche zur Erhöhung der Testempfindlichkeit

Um in den Meßbereich von LH in Rinderserum zu kommen, war es notwendig, die Empfindlichkeit des Testsystems zu erhöhen. Aus diesem Grund mußte die zunächst von Schindlmayr (1973) übernommene Methode der Rezeptorpräparation und die Inkubationsbedingungen verändert werden.

Die Verschiebung des Meßbereiches von 30 - 1000 ng LH pro Ansatz (50 % Intercept: 76 ng, Schindlmayr 1973)

auf 0,5 - 50 ng pro Ansatz (50 % Intercept: 3,7 ng) wurde im wesentlichen durch Verdünnung der Rezeptorsuspension erreicht. (Abb. 9)

Hierbei mußte berücksichtigt werden, daß bei zunehmender Verdünnung die absolute Bindung abnahm.

Mit der Veränderung der unter 2.1. beschriebenen Homogenisierungstechnik konnte die Kurvenempfindlichkeit weiterhin verbessert werden. Abb. 10 zeigt den Unterschied von mit dem "Potter" und mit dem "Bühler" zerkleinertem Hodengewebe.

Die Tötungsmethode der Ratten, ob mit Chloroform oder mit Stickstoff, war ohne Auswirkung auf die Rezeptorqualität.

Ein Zusatz des Proteaseninhibitors Trasylol (Bayer, Leverkusen) hatte ebenfalls einen günstigen Einfluß auf die Kurvenempfindlichkeit. (Abb. 11)

Es stellte sich heraus, daß durch das Zufügen von Serumextrakt zur Standardkurve eine zusätzliche Steigerung der Empfindlichkeit erkennbar wurde. (Siehe auch Abb. 11)

Die Menge des zugefügten ^{125}J -HCG beeinflußt sowohl die absolute Bindung als auch die Kurvensteilheit, d.h. die Empfindlichkeit. Mit zunehmender Konzentration nimmt die absolute Bindung sowie die Empfindlichkeit ab.

Beim Inkubationsvorgang wirkte sich eine halbstündige Vorinkubation ohne ^{125}J -HCG begünstigend auf die Empfindlichkeit aus. Diese oben genannten Modifikationen wurden in den endgültigen Arbeitsgang der eigenen Versuche einbezogen.

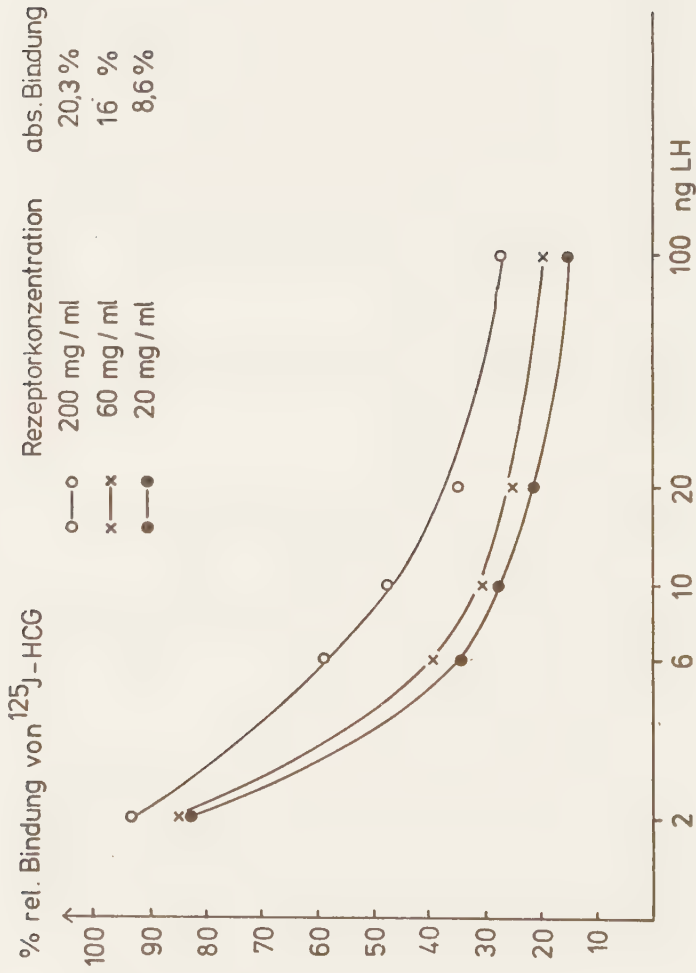


Abb. 9 Einfluß der Rezeptorkonzentration auf die Empfindlichkeit der Standardkurve sowie die absolute Bindung

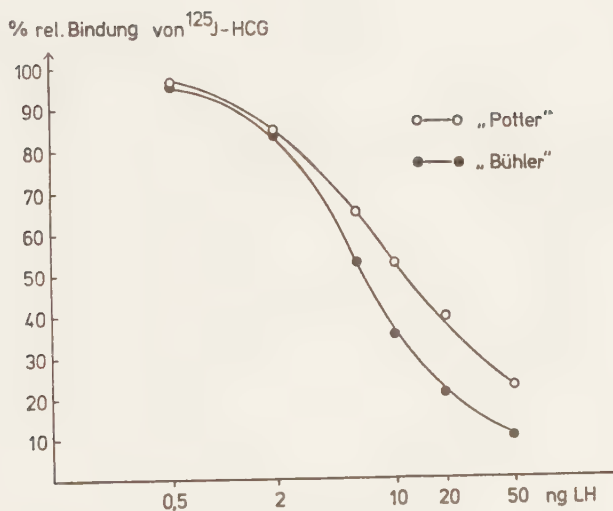


Abb. 10 Einfluß der Homogenisierungstechnik auf die Empfindlichkeit der Standardkurve

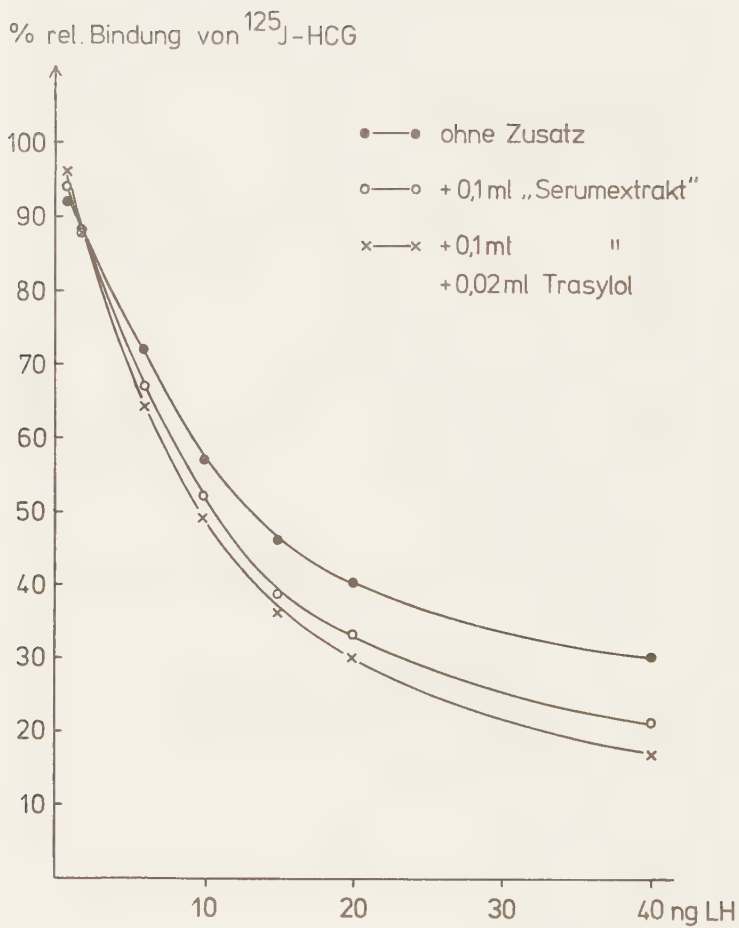


Abb. 11 Einfluß des Zusatzes von "Serumextrakt" und Trasylol auf die Empfindlichkeit der Standardkurve

3. Physiologische Ergebnisse und Vergleich mit radioimmunologisch gemessenen Werten

3.1. LH-Werte während des physiologischen Zyklus weiblicher Rinder

Die eigenen Versuche mittels des Rezeptortests wurden in Serum bzw. Plasmaproben durchgeführt, die bereits mit einer radioimmunologischen Methode (nach Schams & Karg 1969) auf LH untersucht worden waren, bzw. für die gleichzeitig im Rahmen der Teamarbeit im Institut entsprechende Werte ermittelt wurden. Abb. 12 zeigt den präovulatorischen LH-Gipfel zweier weiblicher Rinder. Bei den in 6-stündlichem Abstand genommenen Blutproben stimmen die Gipfelwerte beider Testmethoden zeitlich genau überein. Die LH-Werte sind im Rezeptortest im Bereich der Gipfelwerte etwa 2 mal höher als im Radioimmunotest, im Bereich der Basiswerte ist der Unterschied durchschnittlich 8-fach.

In Abb. 13 ist die LH-Serumkonzentration während eines gesamten physiologischen Zyklus dargestellt. Auch hier ist wieder die zeitliche Übereinstimmung des präovulatorischen LH-Gipfels zu erkennen. Der Gipfelwert ist im RRT wieder doppelt so hoch wie im RIT, die übrigen Werte liegen etwa 8 mal höher als die radioimmunologisch gemessenen.

Den Serum-LH-Verlauf eines physiologischen Zyklus zeigt auch Abb. 14 bei dem weiblichen Jungrind Rokpe. Eine während des 5. und 6. Zyklustages erhöhte LH-Konzentration auf 5 ng/ml im RIT wurde auch im RRT deutlich nachgewiesen.

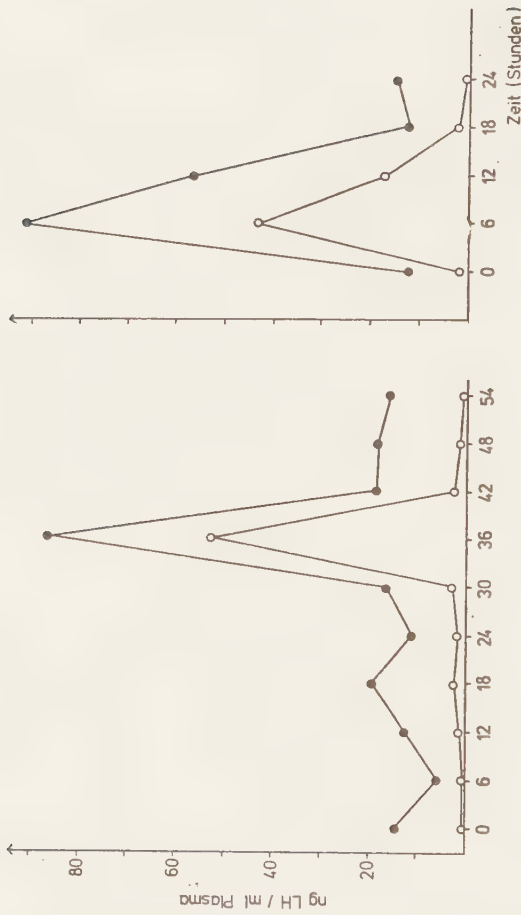


Abb. 12 LH-Konzentrationen im Plasma während des präovulatorischen LH-Gipfels des physiologischen Zyklus zweier Rinder, vergleichend gemessen im RIT $\circ$ — $\circ$ und RRT $\bullet$ — $\bullet$

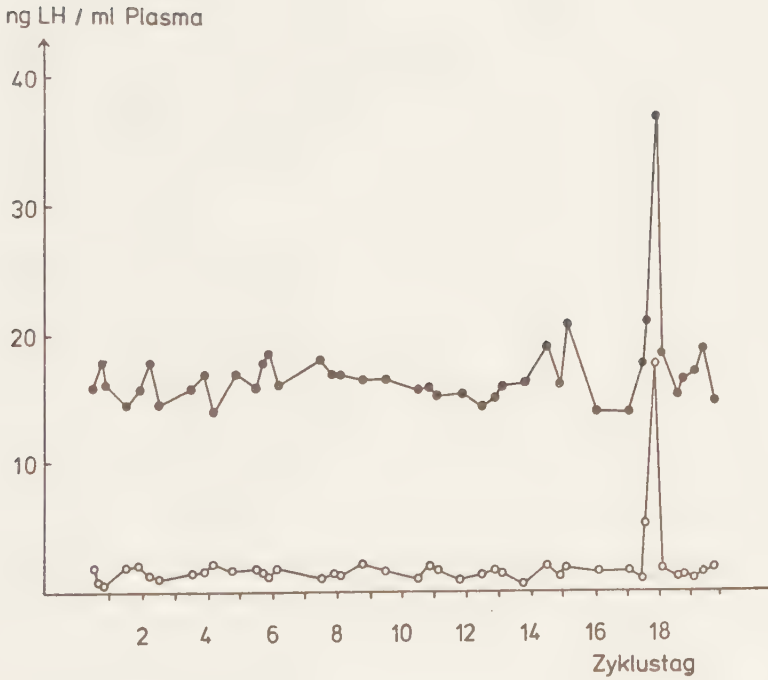


Abb. 13 LH-Konzentrationen im Plasma während eines physiologischen Zyklus, vergleichend gemessen im RIT $\circ$ — $\circ$ und RRT $\bullet$ — $\bullet$

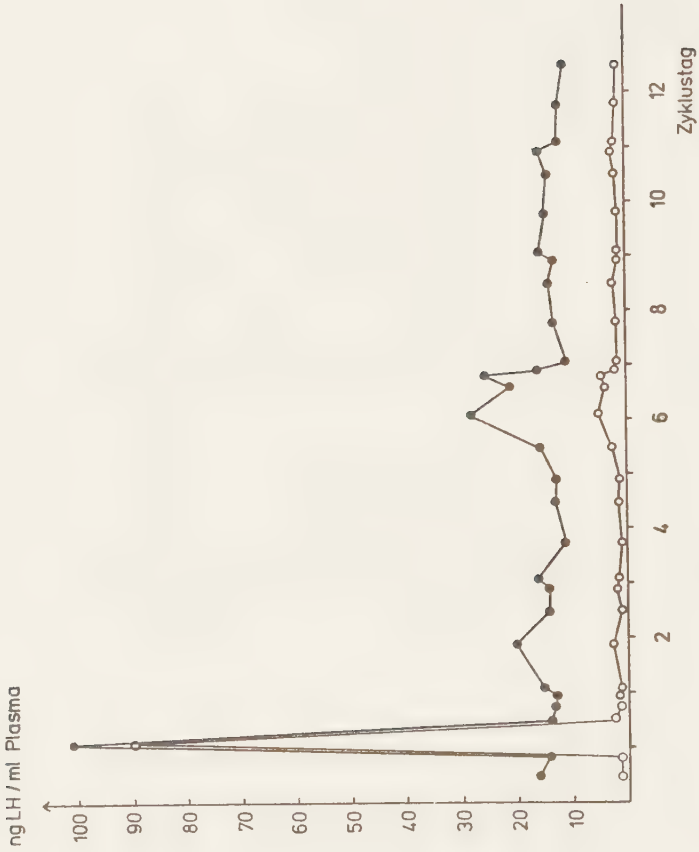


Abb. 14 LH-Konzentrationen im Plasma während eines physiologischen Zyklus von Kalb Rokpe, vergleichend gemessen im RIT ○—○ und RRT ●—●

3.2. LH-Werte nach Injektion von Gn-RH

Abb. 15 zeigt die LH-Freisetzung nach intravenöser Injektion von 250 µg Gn-RH (LRH-Hoe 471, Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt) in Abhängigkeit vom Zyklusstand der Kalbin Rita (Versuche siehe Hartl 1974). Sowohl am 12. als auch am 18. Zyklustag entspricht der Verlauf der LH-Werte im RIT dem der im RRT gemessenen. Deutlich sind auch hier die höheren Rezeptortestwerte.

Zwei Kälbern wurde Gn-RH mehrmals in verschiedenen Altersstufen intravenös verabreicht. Die Dosierung wurde entsprechend dem Körpergewicht mit 1 µg/kg Körpergewicht gewählt (Hartl 1974).

In Abb. 16 ist der LH-Verlauf nach Gn-RH-Injektion bei dem weiblichen Kalb Kleva dargestellt, Abb. 17 zeigt die LH-Werte bei dem Kalb Klara. Bei beiden Tieren erfolgte die LH-Ausschüttung im Vergleich der Testmethoden in zeitlich gleichem Ablauf.

Dem Bullen Kaliro wurde jeweils eine Injektion Gn-RH in hoher Dosierung (1500 µg) an drei aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht (Höfer 1973). Auch hier folgt die im Rezeptortest gemessene Serum-LH-Konzentration im Prinzip der im Radioimmunotest gemessenen, wie Abb. 18 verdeutlicht. Bemerkenswert ist hierbei jedoch, daß die RRT-Werte nach der ersten Gn-RH-Injektion unter denen des RIT bleiben.

3.3. LH-Werte nach PMSG-Injektion

Im Rahmen von Versuchen zur Superovulationsauslösung wurden die LH-Konzentrationen im Serum bei

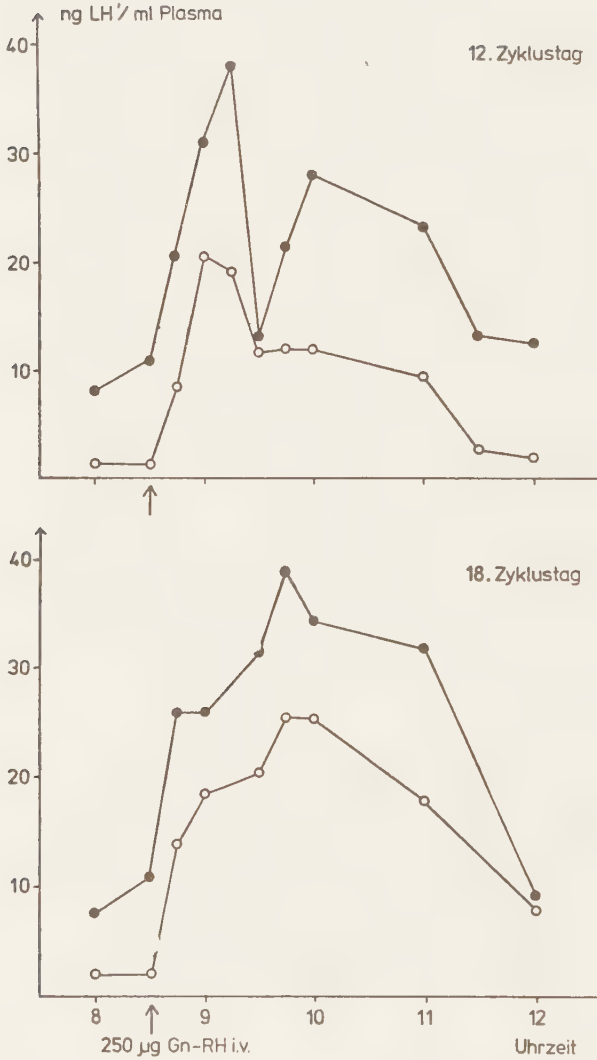


Abb 15 LH-Konzentrationen im Plasma nach Injektion von Gn-RH (20 µg) in Abhängigkeit vom Zyklusstand, vergleichend gemessen im RTO—○— und RRT ●—●—

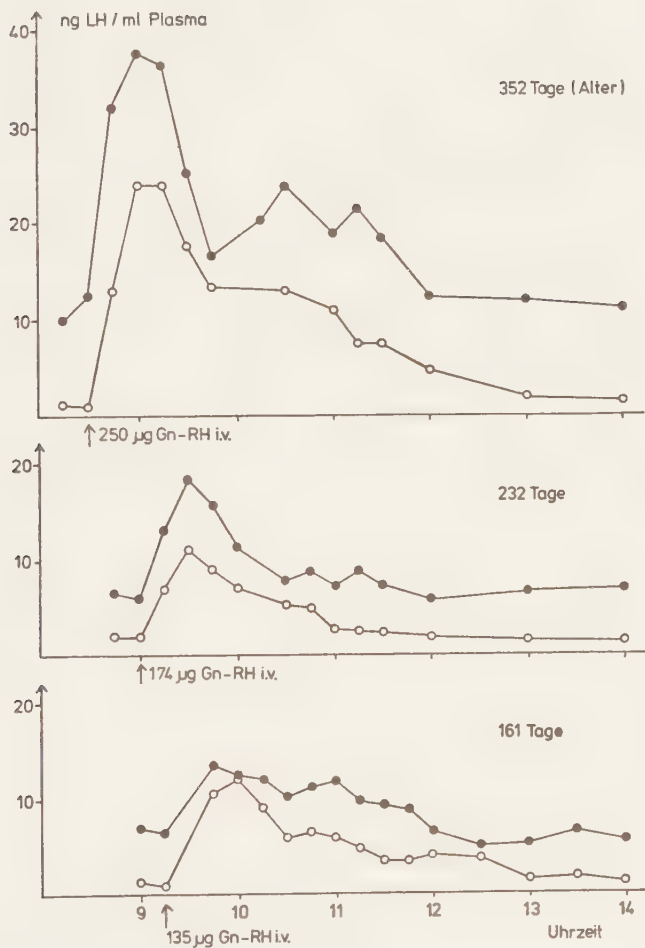


Abb. 16 LH-Konzentrationen im Plasma nach Injektion von Gn-RH (1 µg/kg) bei Kalb Kleba in Abhängigkeit vom Lebensalter, vergleichend gemessen im RIT ○—○ und RRT ●—●

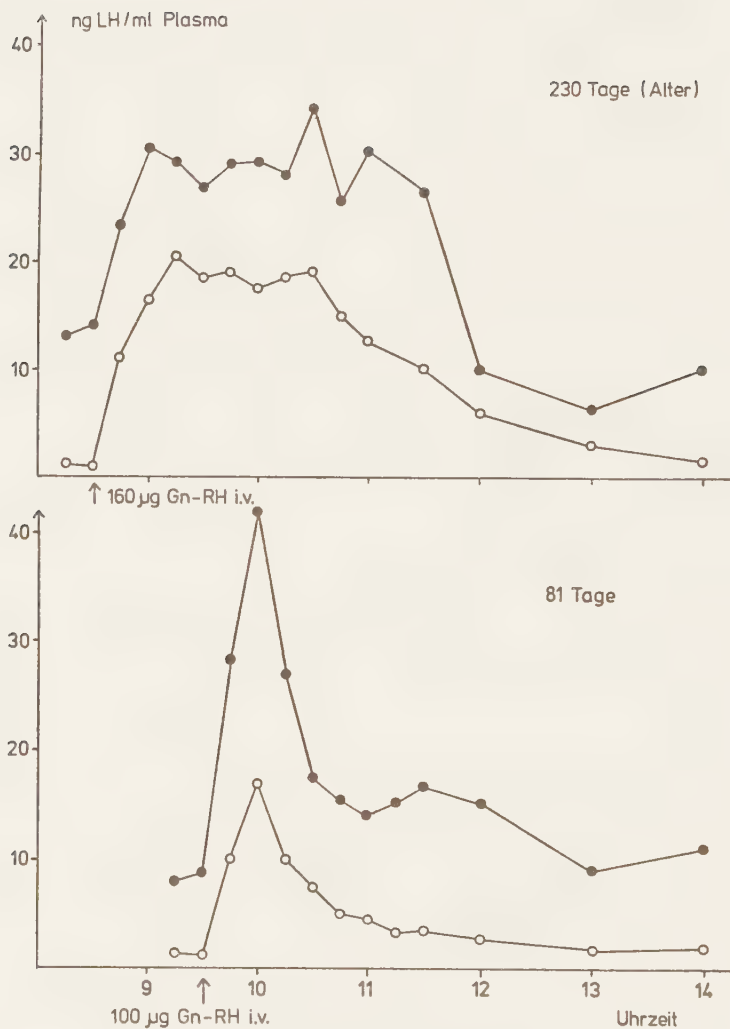


Abb. 17 LH-Konzentrationen im Plasma nach Injektion von Gn-RH (1 µg/kg) bei Kalb Klara in Abhängigkeit vom Lebensalter, vergleichend gemessen im RIT ○—○ und RRT ●—●

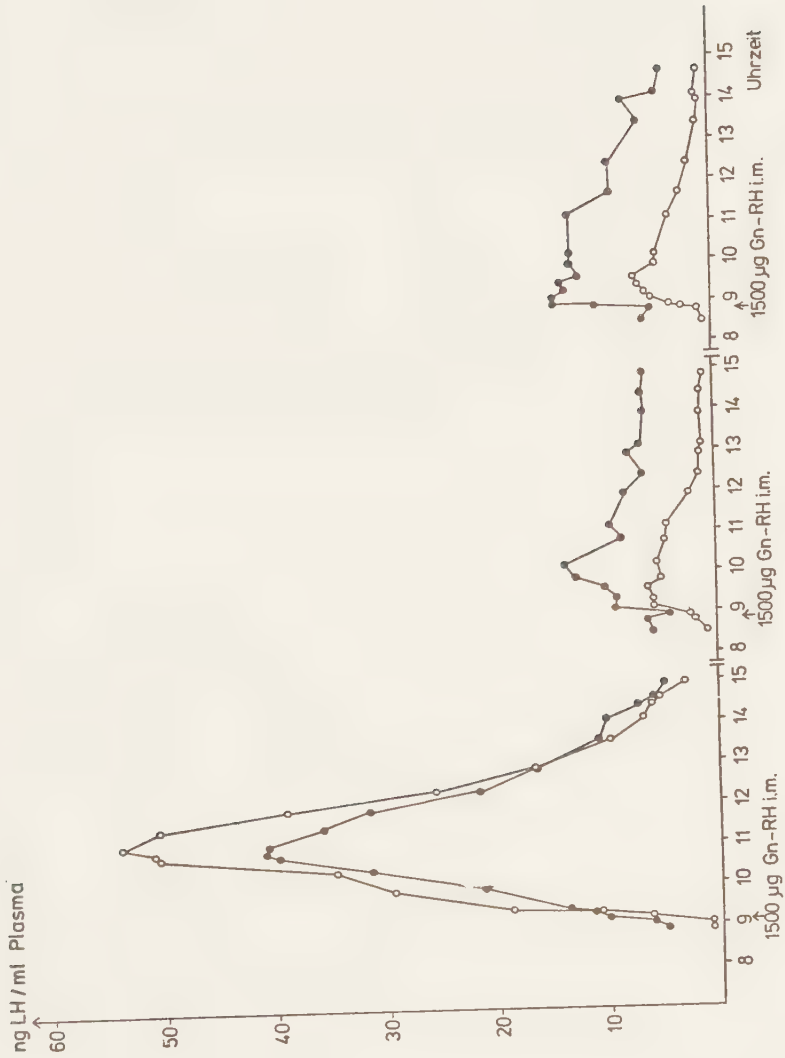


Abb. 18 LH-Konzentrationen im Plasma nach Injektion von 1500 µg Gn-RH an drei aufeinanderfolgenden Tagen beim Bullen Kaliro, vergleichend gemessen im RIT ○—○ und RRT ●—●

einem Rind auch mit dem Rezeptortest bestimmt. Nach der Injektion von PMSG (2100 IU Anteron, Schering, Berlin) und der 2 Tage später folgenden Injektion des Prostaglandinanalogs ICI 80 996 (500 µg) wurde radioimmunologisch ein deutlicher präovulatorischer LH-Peak gemessen. Abb. 19 zeigt, daß der im Rezeptortest ermittelte Peak-Wert zeitlich mit dem radioimmunologischen Wert übereinstimmt.

In Abb. 20 wurden die Mittelwerte der Serum-LH-Konzentrationen von vier weiteren mit PMSG stimulierten Rindern zum Zeitpunkt des Prostaglandin-induzierten LH-Anstiegs aufgetragen. Die Abbildung verdeutlicht wiederum den zeitlich gleichen Verlauf der LH-Ausschüttung.

3.4. Relation der Ergebnisse aus RRT und RIT

Das Verhältnis der Werte aus Rezeptortest und Radioimmunotest bei der Bestimmung von Einzelproben verschiedener Tiere zeigt Tabelle 4. Anhand von Tabelle 5 wird deutlich, daß die im Rezeptortest bestimmten LH-Werte die radioimmunologisch gemessenen besonders im Bereich der Basiswerte weit übertreffen. Eine deutliche Umkehrung des Verhältnisses der Werte aus RRT und RIT wurde nur in zwei Fällen festgestellt. Beim Bullen Kaliro (Abb. 18) liegen alle RIT-Meßwerte im Verlauf des LH-Anstiegs nach Gn-RH-Injektion niedriger als im RIT und aus Tabelle 4 ist zu ersehen, daß der RIT-Wert des Bullen VII etwa doppelt so hoch ist, wie der im Rezeptortest ermittelte. Mit zunehmender Konzentration im RIT verkleinert sich das Verhältnis der Meßergebnisse (Tab. 5). Anhand der vergleichend mit dem Radioimmunotest und dem Rezeptortest ermittelten LH-Gipfelwerte von Rindern aus dem PMSG-Versuch

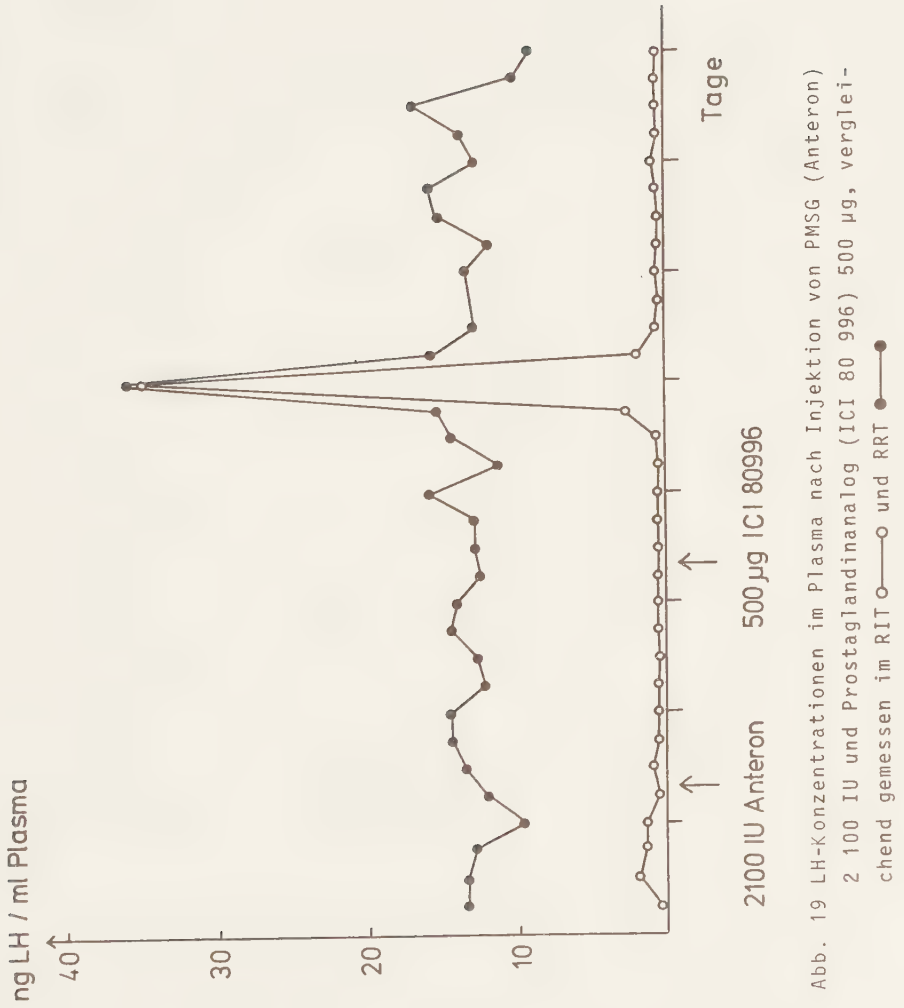


Abb. 19 LH-Konzentrationen im Plasma nach Injektion von PMSG (Anteron)
2 100 IU und Prostaglandinanalogs (ICI 80 996) 500 µg, vergleichend gemessen im RIT ○—○ und RRT ●—●

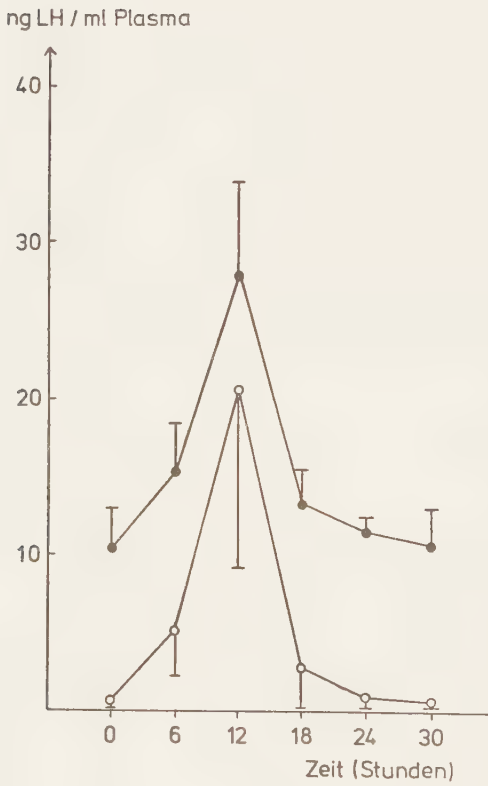


Abb. 20 LH-Mittelwerte mit Standardabweichung des präovulatorischen Peaks von vier Rindern nach einer Behandlung zur Superovulationsauslösung. RIT ○—○ und RRT ●—●

(siehe auch 3.3) ist zu ersehen (Abb. 21), daß das RIT/RRT-Verhältnis bei hoher RIT-Konzentration (35 ng/ml) 1.03 beträgt und mit abnehmenden RIT-LH-Werten größer wird. Bei 22 ng/ml RIT-LH ist das Verhältnis 1,3 bei 17 ng/ml 1,6 und bei 7,5 ng/ml im RIT schließlich 2,8.

Tabelle 4

	RRT ng/ml	RIT ng/ml	RRT/RIT
Bulle Kabine	44,5	33	1,3
Bulle VII	18,6	33	0,56
Laila	46	51,5	0,9
Adria	9,7	0,9	10,8

Tabelle 5

RIT ng/ml	RRT/RIT		V_k %
	$\bar{x}$	$\pm s$	
bis 2	11,8	$\pm 4,5$	38
2 - 5	4,7	$\pm 1,45$	31
5 - 10	2,8	$\pm 0,76$	27
10 - 15	2,5	$\pm 0,32$	12,7
15 - 20	1,9	$\pm 0,36$	19,2

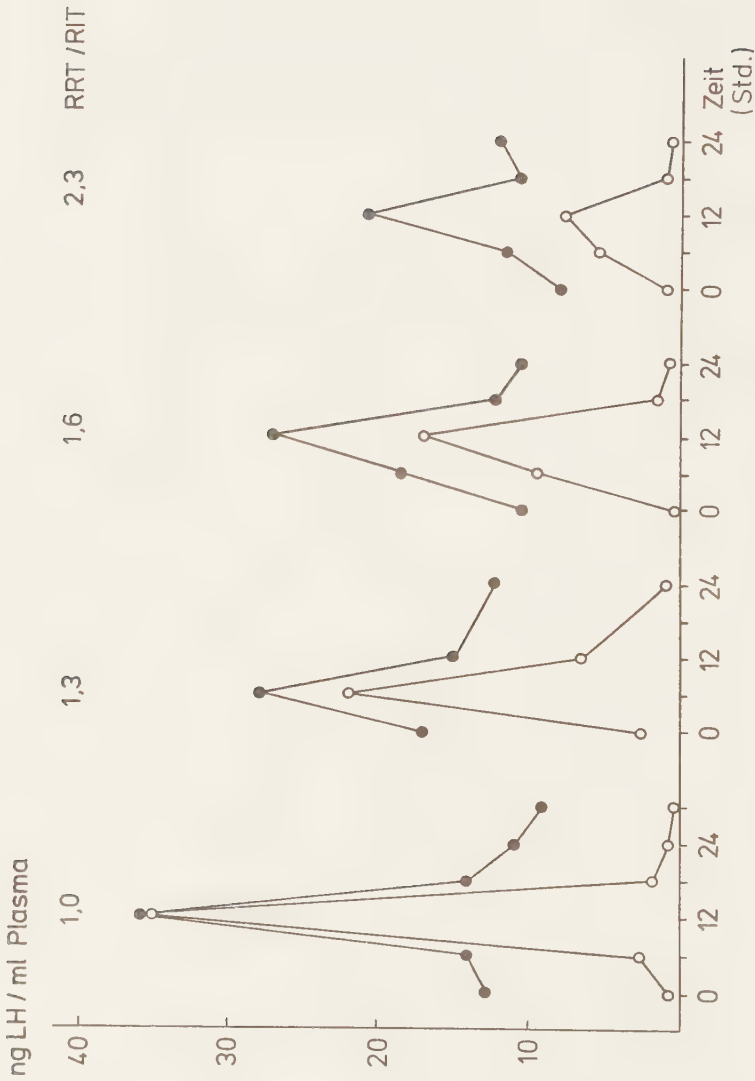


Abb. 21 Serum-LH-Konzentrationen von vier Rindern mit abnehmender Höhe der Gipfelwerte, vergleichend gemessen mit RIA ○—○ und RRA ●—●

4. DISKUSSION

Der Versuch, einen Rezeptortest im "Zeitalter des Radio-Immunotests" einzuführen, findet seinen Sinn und Zweck darin, zum einen die physiologische Relevanz der radioimmunologisch ermittelten Werte zu bestätigen, zum anderen bisherige Diskrepanzen zwischen Radioimmunotest und Biotest auf einem dritten Weg zu erklären.

Die zunächst von Schindlmayr (1973) übernommene Methode zur Durchführung des Rezeptortests mußte, um den Erfordernissen der LH-Bestimmung im Serum zu entsprechen, in vieler Hinsicht geändert werden.

Die Präparation der geeigneten Rezeptorsuspension aus dem Homogenat von Rattenhoden zielte vor allem darauf hin, die Empfindlichkeit des Meßsystems zu erhöhen, um überhaupt in den Bereich physiologischer LH-Konzentrationen zu kommen. Dies gelang im wesentlichen durch eine Verringerung der Konzentrationen von Rezeptorsuspension und radioaktiv markiertem HCG. Die absolute Bindung nahm zwar, wie durch das verringerte Rezeptorangebot auch zu erwarten war, durch die Verdünnung der Rezeptorsuspension ab, die Kurvenempfindlichkeit nahm jedoch deutlich zu. Bei der Senkung der Konzentration des markierten HCG ergab sich neben der Empfindlichkeitserhöhung auch eine Erhöhung der absoluten Bindung. Dies erklärt sich aus einer Sättigungsreaktion, die - unabhängig von der zunehmenden Gesamtkonzentration des markierten Hormons - stattfindet. Die Erhöhung der Empfindlichkeit kann als ein Erfolg des Versuchs zur Optimierung der Konzentrationen der an der Bindungsreaktion beteiligten Substanzen betrachtet werden. Soweit sich die erhöhte Empfindlichkeit des Tests durch die veränderte Homogenisierungstechnik erreichen ließ, ist sie

wohl auf eine verringerte Schädigung des Gewebes durch mechanische oder temperaturbedingte Einwirkungen bei der doch sehr intensiven "Potter"-Homogenisierung zurückzuführen.

Die Zugabe von Rinderserum zum Rezeptortestansatz zeigte, daß der direkten LH-Bestimmung im Serum der störende Einfluß einer unbekannten Serumkomponente entgegenstand. Dieser Einfluß, der auch in menschlichem Serum, allerdings in nicht so starkem Ausmaß, auftrat (Leidenberger et al. 1976), machte sich durch die Hemmung der Bindung von markiertem HCG an den Rezeptor und der daraus folgenden Vortäuschung hoher LH-Werte bemerkbar. Besonders deutlich wurde dies bei der Messung von Serahypophysektomierter Menschen (Leidenberger et al. 1976) wobei eine starke Bindungshemmung auftrat.

Bei Zugabe verschiedener Konzentrationen von exogenem LH zu Serum zeigte sich neben der Bindungshemmung, die durch die niedrige absolute Bindung im Vergleich zum serumfreien Pufferstandard deutlich wurde, eine schlechte Verdrängung des markierten Hormons durch das kalte Hormon. Die Parallelität zur "Pufferstandardkurve" war nicht gegeben. Daraus läßt sich mit Sicherheit schließen, daß der LH-Aktivität vortäuschende Serumfaktor nicht mit dem Standard-LH identisch ist.

Durch Verdünnung des Serums konnte der Störeffekt weitgehend beseitigt werden, jedoch war dann die Testempfindlichkeit wiederum zu gering, um das verbliebene LH messen zu können. In dem von Lee & Ryan (1975) entwickelten hochempfindlichen Rezeptortestsystem machte sich der störende Serumeinfluß durch das geringe Volumen nicht bemerkbar. Diese Methode konnte jedoch auch nur für Seren mit hoher LH-Konzentration angewendet werden. Die Zugabe von Rinderserum zur Standardkurve, zur Kompensation des

Serumeinflusses, schied als mögliche Lösung aus. Dies erklärt sich aus Versuchen von Schindlmayr (1973), die ergaben, daß die störenden Faktoren sich nicht nur im Serum verschiedener Tiere, sondern auch in verschiedenen Proben vom gleichen Tier unterschiedlich stark auswirken.

Die von Leidenberger und Mitarbeitern (1976) erfolgreich angewandten Fällungsmethoden mit Alkohol oder Ammoniumsulfat versagten bei Rinderserum. Möglicherweise hat die im Test auftretende Störung im Serum von Mensch und Rind nicht die gleiche Ursache. Es könnte sich um unterschiedliche Komponenten handeln, die sich aufgrund des unterschiedlichen Stoffwechselsystems ergeben.

Im weiteren wurde versucht, das LH in möglichst reiner Form, in der nur noch ein geringer Fremdproteinanteil war, aus dem Serum zu isolieren. Wie Schindlmayr (1973) nachgewiesen hatte, waren insbesondere Serumproteine an der Störwirkung beteiligt.

Die Elution von Rinderserum über eine Kationenaustauschsäule Carboxymethyl-Sephadex C-50, mittels verschiedener Puffer mit pH-Gradienten erbrachte schließlich eine Abtrennung des Großteils der Serumproteine vom LH, sowie eine genügend hohe Ausbeute an gereinigtem Hormon.

Bei der Überprüfung der Gültigkeitskriterien stellte sich jedoch heraus, daß die Wiederfindung von dem Serum zugesetzten exogenen LH-Mengen beträchtlich über 100 % lag und nicht konstant war, sondern mit zunehmender LH-Konzentration noch anstieg. Da dieser Effekt auf einen in dem gereinigten Extrakt noch verbliebenen störenden Faktor hindeutete, wurde versucht, dies durch Zugabe eines Aliquots, eines auf gleiche Weise gereinigten Extraktes aus LH-armem Bullenserum zu Standardkurve und Proben zu kompensieren.

Die Wiederfindungswerte wurden entsprechend einem Verlustfaktor korrigiert, der sich aus der Wiederfindung von radioaktiv-markiertem LH nach der Säulenreinigung ergab. So wurde eine Wiederfindung von durchschnittlich 105 % erhalten. Diese erhöhten Wiederfindungswerte wurden mit der Annahme erklärt, daß sich das markierte LH auf der Säule nicht notwendigerweise identisch wie kaltes Hormon verhalten muß. Daher wurde rein rechnerisch der Verlustfaktor um 5 % gesenkt.

Obwohl der Rezeptortest als hochspezifischer Test anerkannt ist, wurde der Einfluß von LH α - und LH β -Untereinheiten, sowie von FSH allein und in Kombination mit LH auf den Rezeptortest überprüft. Weder FSH noch LH-Subunits beeinflussten im Rahmen physiologischer Konzentrationen die LH-Meßbarkeit, wie dies im Gegensatz dazu z.B. im cytohistochemischen Biotest, der allerdings auf einem anderen Prinzip beruht, zu beobachten war (Kramer et al. 1976). Auch im in-vivo-Biotest (OAAD-Test) hatte sich, wie von Brüggemann, Adam und Karg (1965) festgestellt worden war, ein Einfluß von FSH auf die Erfassbarkeit des LH bemerkbar gemacht. Mögliche Einflüsse von höheren FSH-Konzentrationen als sie in den eigenen Versuchen verwendet wurden, können jedoch nicht zur Erklärung von Diskrepanzen zwischen den Absolutwerten unserer Ergebnisse im Rezeptor- und Radioimmunotest herangezogen werden. Durch die Fraktionierung des Serums mittels Ionenaustauschchromatographie an CM-Sephadex C-50, einem Verfahren, das als Reinigungsmethode für FSH bekannt ist, wird die FSH-Fraktion von der LH-Fraktion isoliert (Schams & Schallenberger 1976).

Die im Test festgestellte LH-Aktivität der verwendeten β -Subunit-Präparation läßt auf eine Verunreinigung mit intaktem LH schließen, da Untereinheiten kein Bindungsvermögen an den Rezeptor aufweisen. Auch der durch FSH in hoher Konzentration bedingte Kurvenabfall ist auf eine Konta-

mination mit LH zurückzuführen. Der Kurvenverlauf von HCG und PMSG zeigt noch einmal die deutliche LH-Aktivität beider Hormone.

Was die physiologischen Ergebnisse betrifft ließ sich feststellen, daß die mit dem Rezeptortest gemessenen Werte die radioimmunologischen quantitativ übertrafen. Dies war auch von anderen Autoren, die mit Humanserum arbeiteten, beim Vergleich der beiden Methoden zur LH-Messung gefunden worden (s. Literaturteil). Wie auch Leidenberger et al. (1976) berichteten, bestand bei Individualproben kein einheitliches RRT/RIT-Verhältnis, sondern es schwankte von 1,4 bis 20,3. Bei den Versuchen mit Rinderserum wurde die Tendenz deutlich, daß bei radioimmunologischen Basiswerten, d.h. Werten unter 1 ng/ml das RRT/RIT-Verhältnis mit Werten um 10 am größten war und mit steigender LH-Konzentration im RIT nur mehr 1 bis 2 betrug. Die Vermutung bestätigte sich nicht, daß die hohen Basiswerte ihre Ursache in einem Ables- und Multiplikationsfehler an der Auswertgrenze der Standardkurve hätten, da auch nach Konzentrierung des Serumextraktes die Basiswerte nicht gesenkt werden konnten. Bei einer reinen Höhenverschiebung der Meßwerte durch einen, das unterschiedliche Testprinzip charakterisierenden Faktor, wäre ein konstantes RRT/RIT-Verhältnis zu erwarten. Sollten die hohen Basiswerte biologische Relevanz haben, so könnte man die RRT/RIT-Diskrepanz durch die Anwesenheit von immunologisch noch nicht oder nicht mehr aktiven LH-Molekülen mit Rezeptorbindungsaktivität erklären. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß auch nach der säulenchromatographischen Reinigung des Serums noch ein Rest der ursprünglichen Störfaktoren vorhanden ist, der sich besonders im Basisbereich bemerkbar macht.

Die Gegenüberstellung der Werte zweier radioimmunologisch gemessener präovulatorischer LH-Gipfel im physiologischen

Zyklus von zwei Rindern mit den im Rezeptortest bestimmten Werten zeigt die genaue zeitliche Übereinstimmung. Auch bei der Betrachtung des physiologischen Zyklus von zwei weiblichen Jungrindern über einen längeren Zeitraum wird deutlich, daß nach einem mehr oder weniger gleichmäßigen, niedrigen Konzentrationsverlauf mit beiden Tests gleichzeitig der präovulatorische LH-Peak nachzuweisen ist. Bei Kalb Rokpe zeigt sich ein zwischen Tag 5 und Tag 6 des Zyklus auftretender Konzentrationsanstieg übereinstimmend im Radioimmuno- und im Rezeptortest.

Die von Leidenberger et al. (1976) festgestellten Diskrepanzen im zeitlichen Verlauf der LH-Ausschüttung bei der Frau wurden in unseren Versuchen beim Rind nicht beobachtet. Bemerkenswert war bei den Ergebnissen mit Humanserum von Leidenberger et al. (1976), daß in einem der Versuche der mittzyklische LH-Peak im RRT um einen Tag früher auftrat, ein Befund, der in keinem der von uns untersuchten Fälle gemessen werden konnte.

Die LH-Ausschüttung nach Gn-RH-Injektion, die in verschiedenen physiologischen Stadien erfolgte, wurde vergleichend mit beiden Testmethoden gemessen. Anstieg und Abfall des Serum-LH nach Injektion verschieden hoher Dosierungen von Gn-RH erfolgten in zeitlicher Übereinstimmung. Der bei Bulle Kaliro radioimmunologisch gemessene sehr hohe LH-Anstieg nach einer hohen intramuskulären Gn-RH-Injektion übertrifft bemerkenswerterweise den gleichzeitig erscheinenden Anstieg des mit dem Rezeptortest gemessenen LHs. Die nach der hohen Releasinghormon-Injektion ausgeschüttete große LH-Menge enthält möglicherweise einen gewissen Teil "unfertiger", biologisch noch nicht aktiver Hormonmoleküle, die jedoch bereits immunologisch aktiv sind.

Der Verlauf der Serum-LH-Konzentrationen bei Rindern, die zur Auslösung der Superovulation PMSG verabreicht bekamen, ist im Radioimmuno- und Rezeptortest übereinstimmend. Auch hinsichtlich des zeitlichen Ablaufs der bei diesen Versuchen durch ein Prostaglandinanalogue induzierten LH-Ausschüttung nach Luteolyse unterschieden sich die Ergebnisse aus beiden Methoden nicht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß nach diesen ersten Versuchen zur LH-Bestimmung in Rinderserum mit einem Rezeptortest deutlich wird, daß sich Rezeptortest und Radioimmunotest in ihrer qualitativen physiologischen Aussage nicht unterscheiden.

Die Diskrepanz zwischen den Absolutwerten, wie sie auch von Leidenberger et al. (1976) festgestellt worden waren, bestätigten die bereits 1969 von Karg et al. anhand der aus Vergleichen zwischen Ovaraskorbinsäure- und Radioimmunotest erhaltenen Ergebnisse. Eine Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden.

Von dieser Tatsache ausgehend bietet der Radioimmunotest auch weiterhin aus Gründen der Einfachheit der Methode und der großen Testkapazität große Vorteile gegenüber dem Rezeptortest, der wegen der langwierigen Aufarbeitungsschritte zur Serumreinigung für große Probenzahlen ungeeignet ist. Für Fälle, bei denen der Radioimmunotest nicht anwendbar ist, bietet sich der Rezeptortest als Alternativmethode an, da er einfacher durchzuführen und empfindlicher ist, als der in-vivo-Biotest. Solche Anwendungsgebiete können etwa in Versuchen gesehen werden, in denen die LH-Aktivität bei Spezies bestimmt werden soll, für die spezifische oder kreuzreagierende RIT-Systeme noch nicht erarbeitet werden konnten. Wie die vorliegenden Erfahrungen beim Rind gezeigt haben, müßten dann aber auch eventuelle speziesbedingte interferierende Serumfaktoren berücksichtigt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde ein Radioligand-Rezeptortest erarbeitet, mit dem es möglich ist LH (Lutropin) in Rinderblut zu messen.

Als Rezeptorquelle dieses in-vitro-Biotests diente Rattenhodenhomogenat, das durch Tiefgefrieren (-80°C) konserviert werden konnte.

Die Anwendung des Rezeptortests zur Serum-LH-Bestimmung wurde bisher durch das Auftreten unbekannter Störfaktoren im Serum, die eine Vorbehandlung des Serums notwendig machten, verhindert. Verdünnung des Serums oder Serumzugabe zur Standardkurve genügten nicht zur Ausschaltung der Störwirkung.

Verschiedene für Humanserum erfolgreich angewandte Methoden (Alkohol- oder Ammoniumsulfatfällung) erwiesen sich für Rinderserum als ungeeignet.

Erst die Reinigung des Serums über die CM-Sephadex C-50-Ionenaustauschsäule ermöglichte die Erstellung einer Serum-LH-Meßmethode, die die Gültigkeitskriterien hinsichtlich Wiederfindung zugesetzter LH-Mengen, Reproduzierbarkeit, Identität von endogenem und Standard-LH sowie Spezifität erfüllte.

Die Bestimmung von Serum-LH wurde weiterhin durch die Erhöhung der Empfindlichkeit des Testsystems ermöglicht. Der Meßbereich liegt zwischen 0,5 und 50 ng LH (B-LH-DS-A) mit einem 50 %-Intercept-Wert von 3,7 ng. Die wesentliche Steigerung der Empfindlichkeit wurde durch Verdünnung der Rezeptorsuspension erzielt.

Die mit dem gereinigten Serum im Rezeptortest bestimmten LH-Konzentrationen in Proben von verschiedenen physiologischen Stadien waren bezüglich des zeitlichen Ablaufs mit den radioimmunologisch gemessenen Werten vergleichbar. Es zeigte sich aber, daß LH-Gipfel (während des Zyklus, nach Gn-RH-Injektion, nach Stimulation mit PMSG plus ein Prostaglandinanalogue) im Rezeptortest meist doppelt so hoch waren wie im Radioimmunotest, die Basiswerte waren durchschnittlich um das 8fache höher.

SUMMARY

For determination of LH from bovine plasma or serum a radioligand - receptorassay has been developed using at - 60° C stored rat testicular homogenate as receptor source.

Until now measurement of hormone in serum had been impossible due to interferences of non - specific serum contents. Pretreatment of the serum prior to assay has been necessary.

Dilution of serum or addition of serum to the standard did not prove effective.

Methods which had been successfully applied for LH - determination in human serum, such as precipitation with ethanol or ammonium sulfate turned out to be unsuitable for the bovine species.

Purification of serum by CM - Sephadex C-50 ion exchange chromatography enabled to establish a method for LH - determination in bovine blood. The assay complied with the criteria of validation as recovery of added LH to serum, reproducibility, identity of standard and endogenous LH and specificity.

Furthermore measurement of LH in serum has been rendered possible by increasing sensitivity of the assay system ranging now from 0.5 - 50 ng LH (B-LH-DS-A) with a 50 % - intercept value of 3.7 ng. The main improvement was a further dilution of the receptor suspension.

LH concentrations in purified serum samples of different physiological conditions showed a comparable pattern, either measured by receptor - or by radioimmunoassay. But obviously LH - peak - values (during the oestrous cycle, after application of Gn-RH, and after stimulation with PMSG plus a prostaglandin analog) determined in the receptorassay exceeded about twice those measured by means of radioimmunoassay, whereas basal values have been, on an average, eightfold higher.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Albert A., Rosemberg E., Ross G.T., Paulsen C.A.,
Ryan R.J. 1968
Report of the national pituitary agency collaborative study of the radioimmunoassay of FSH and LH
J. Clin. Endocrinol. Metab. 28, 1214
- Amsterdam A., Koch Y., Liebermann M.E.,
Lindner H.R. 1975
Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat
J. Cell Biology 67, 894 - 900
- Anderson W., Ryan R.J. 1976
unveröffentlicht, zitiert aus Ryan R.J., Lee C.Y.
(1976)
- Bahl O.P. 1971
Some of the problems related to the primary structure of glycoprotein hormones

In: Protein and Polypeptide Hormones. I. Excerpta Medica, Eds.: Margoulies M., Greenwood F.C., Amsterdam, pp. 99 - 111
- Bahl O.P., Carlsen R.B., Bellisario R., Swaminathan N.,
1972
Human chorionic gonadotropin: Amino acid sequence of the α - and β -subunits.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 48, 416 - 422
- Beall R.J., Sayers G. 1972
Isolated adrenal cells: Steroidogenesis and cyclic AMP accumulation in response to ACTH.
Arch. Biochem. Biophys. 148, 70 - 76

- Bellisario R., Bahl O.P., 1975
Human chorionic gonadotropin. V. Tissue specificity of binding and partial characterization of soluble human chorionic gonadotrophin-receptor complexes
J. Biol. Chem. 250, 3837 - 3844
- Benveniste L.A., Frohman A., Rabinowitz D., 1975
Heterogeneity of purified human pituitary luteinizing hormone: Effect on hormone measurement by radioimmunoassay
Endocrinology 97, 20 - 29
- Berson S.A., Yalow R.S., 1968
Immunochemical heterogeneity of parathyroid hormone in plasma
J. Clin. Endocrinol. Metab. 28, 1037 - 1047
- Birnbaumer L., Pohl S.K., Kraus M.L., Rodbell M., 1970
The action of hormones on the adenylyl-cyclase system
Adv. Biochem. Psychopharm. 3, 185 - 208
- Birnbaumer L., Pohl S.L., Kaumann A.J., 1974
Receptors and acceptors: A necessary distinction in hormone studies
Adv. Cyclic Nucl. Res. 4, 239 - 281
- Braendle W., Breckwoldt M., Graesslin D., Weise H.Ch., 1973
Distribution and binding of J¹³¹-human chorion gonadotropin (HCG) in different organs of pseudopregnant female rats
Fertility and Sterility 24, 126 - 129

- Brüggemann J., Adam A., Karg H. 1965
ICSH-Bestimmungen in Hypophysen von Rehböcken und
Hirschen unter Berücksichtigung des Saisoneinflus-
ses
Acta Endocrinol. 48, 569-580
- Catt K.J., Dufau M.L., Tsuruhara T. 1971
Studies on radioligand-receptor assay system for
luteinizing hormone and chorionic gonadotropin
J. Clin. Endocrinol. Metab. 32, 860 - 863
- Catt K.J., Dufau M.L., Tsuruhara T. 1972
Radioligand-receptor assay of luteinizing hormone and
chorionic gonadotropin
J. Clin. Endocrinol. Metab. 34, 123 - 132
- Catt K.J., Watanabe K., Dufau M.L. 1972
Cyclic AMP released by rat testis during gonadotropin
stimulation in vitro
Nature 239, 280 - 281
- Catt K.J., Tsuruhara T., Dufau M.L. 1972
Gonadotropin binding sites of the rat testis
Biochim. Biophys. Acta 279, 194 - 201
- Catt K.J., Dufau M.L. 1973 a
Spare gonadotropin receptors in rat testis
Nature New Biology 244, 219 - 221
- Catt K.J., Dufau M.L. 1973 b
Interactions of LH and hCG with testicular gonadotro-
phin receptors
In: Receptors for Reproductive Hormones. Vol. 36,
Eds.: O'Malley B.W., Means A.R., Plenum Press
New York, pp. 379 - 418

- Catt K.J., Dufau M.L., Tsuruhara T. 1973
Absence of intrinsic biological activity in LH
and hCG subunits
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36, 73 - 80
- Catt K.J., Dufau M.L., Neaves W.B., Walsh P.C.,
Wilson J.D. 1975
LH-hCG receptors and testosterone content during
differentiation of the testis in the rabbit embryo
Endocrinology 97, 1157 - 1165
- Catt K.J., Dufau M.L., Vaitukaitis J.L. 1975
Appearance of hCG in pregnancy plasma following
initiation of implantation of the blastocyst
J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, 537 - 540
- Catt K.J., Dufau M.L. 1976
Basic concepts of the mechanism of action of peptide
hormones
Biol. Reprod. 14, 1 - 15
- Channing C.P. 1974
Temporal effects of LH, hCG, FSH and dibutyryl cyclic
3', 5'-AMP upon luteinization of Rhesus monkey gra-
nulosa cells in culture
Endocrinology 94, 1215 - 1223
- Channing C.P. 1975
Follicle stimulating hormone stimulation of ^{125}J -human
chorionic gonadotropin binding in porcine granulosa
cell cultures
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149, 238 - 241

- Channing C.P., Coudert S.P. 1976
Contribution of granulosa cells and follicular
fluid to ovarian estrogen secretion in the
Rhesus monkey in vivo
Endocrinology 98, 590 - 597
- Charreau E.H., Dufau M.L., Catt K.J. 1974
Multiple forms of solubilized gonadotropin
receptors from the rat testis
J. Biol. Chem. 294, 4189 - 4195
- Cheng K.-W. 1975
A radioreceptor assay for follicle-stimulating
hormone
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41, 581 - 589
- Closset J., Vandalem J.-L., Hennen G. 1975
Human luteinizing hormone
Eur. J. Biochem. 57, 325 - 333
- Combarrous Y., Hennen G. 1974
Luteinizing hormone derivatives with covalently-
linked subunits
FEBS Letters 44, 224 - 228
- Cuatrecasas P. 1969
Interaction of insulin with the cell membranes:
The primary action of insulin
Proc. Nat. Acad. Sci. 63, 450 - 457
- Cuatrecasas P. 1974 a
Insulin receptors, cell membranes and hormone
action
Biochem. Pharm. 23, 2353 - 2361

- Cuatrecasas P. 1974 b
Membrane receptors
Ann. Rev. Biochem. 43, 169 - 214
- van Damme M.-P., Robertson D.M.,
Diczfalusy E. 1974
An improved in vitro bioassay method for measuring
luteinizing hormone activity using mouse Leydig
cell preparations
Acta Endocrinol. 77, 655 - 671
- Danzo B.J., Midgley A.R., Kleinsmith L.J. 1972
Human chorionic gonadotropin binding to rat ovarian
tissue in vitro
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139, 88 - 92
- De la Llosa P., Courte C., Jutisz M. 1967
On the mechanism of reversible inactivation of LH
by urea
Biochem. Biophys. Res. Comm. 26, 411 - 416
- De la Llosa P., Jutisz M. 1969
Reversible dissociation into subunits and biological
activity of ovine luteinizing hormone
Biochim. Biophys. Acta 181, 426 - 436
- Diczfalusy E. 1954
An improved method for the bioassay of chorionic
gonadotropin
Acta Endocrinol. 17, 58 - 73
- Dufau M.L., Catt K.J., Tsuruhara T. 1971
Gonadotropin stimulation of testosterone production
by the rat testis in vitro
Biochim. Biophys. Acta 252, 574 - 579

- Dufau M.L., Catt K.J., Tsuruhara T. 1972 a
Biological activity of human chorionic gonadotropin released from testis binding-sites
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2414 - 2416
- Dufau M.L., Catt K.J., Tsuruhara T. 1972 b
A sensitive gonadotropin response system: Radio-immunoassay of testosterone production by the rat testis in vitro
Endocrinology 90, 1032 - 1040
- Dufau M.L., Catt K.J. 1973
Extraction of soluble gonadotropin receptors from the rat testis
Nature New Biology 242, 246 - 248
- Dufau M.L., Charreau E.H., Catt K.J. 1973
Characteristics of a soluble gonadotropin receptor from the rat testis
J. Biol. Chem. 248, 6973 - 6982
- Dufau M.L., Watanabe K., Catt K.J. 1973
Stimulation of cyclic AMP production by the rat testis during incubation with HCG in vitro
Endocrinology 92, 6 - 11
- Dufau M.L., Charreau E.H., Ryan D., Catt K.J. 1974
Soluble gonadotropin receptors of the rat ovary
FEBS Letters 39, 149 - 153
- Dufau M.L., Mendelson C.R., Catt K.J. 1974
A highly sensitive in vitro bioassay for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin: Testosterone production by dispersed Leydig cells
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39, 610 - 613

- Dufau M.L., Podesta E.J., Catt K.J. 1975
Physical characteristics of the gonadotropin
receptor-hormone complexes formed in vivo and
in vitro
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1272 - 1275
- Dufau M.L., Ryan D.W., Baukal A.J.,
Catt K.J. 1975
Gonadotropin receptors. Solubilization and puri-
fication by affinity chromatography
J. Biol. Chem. 250, 4822 - 4824
- Dufau M.L., Pock R., Neubauer A.,
Catt K.J. 1976
In vitro bioassay of LH in human serum: The rat
interstitial cell testosterone (RICT) assay
J. Clin. Endocrinol. Metab. 42, 958 - 969
- Eshkol A., Lunenfeld B. 1968
Fate and localization of iodine-labelled HCG in
mice
In: Gonadotropins. Ed.: Rosenberg E. Geron-X,
Inc. Los Altos Calif. pp. 187 - 188
- Espeland D.H., Naftolin F., Paulsen C.A. 1968
Metabolism of labelled ¹²⁵I-HCG by the rat ovary
In: Gonadotropins. Ed.: Rosenberg E. Geron-X,
Inc. Los Altos Calif., pp. 177 - 184
- Faiman C., Ryan R.J., Albert A. 1968
FSH and LH activity in urinary extracts: A compa-
rison of radioimmunoassay and bioassay methods
J. Clin. Endocrinol. Metab. 28, 1076 - 1078

- Franchimont P. 1966
Dosage radio-immunologique de l'hormone luteinif-
sante chorionique et hypophysaire
Ann. Endocr. (Paris) 27, 273
- Frowein J., Engel W. 1974
Constitutivity of the HCG-receptor protein in the
testis of rat and man
Nature 249, 377 - 379
- Frowein J., Engel W. 1975
Binding of human chorionic gonadotropin by the rat
testis: Effect of sexual maturation, cryptorchidism
and hypophysectomy
J. Endocrinol. 64, 59 - 66
- Gospodarowicz D., Papkoff H. 1967
A simple method for the isolation of pregnant mare
serum gonadotropin
Endocrinology 80, 699 - 702
- Gospodarowicz D. 1971
Immunologic and steroidogenic activity of the
luteinizing hormone (LH) compared to its two sub-
units CI and CII
Endocrinology 89, 669 - 678
- Gospodarowicz D. 1973
Properties of the luteinizing hormone receptor of
isolated bovine corpus luteum plasma membranes
J. Biol. Chem. 248, 5042 - 5049

- Graesslin D., Weise H.C., Braendle W. 1973
The microheterogeneity of human chorionic gonadotropin reflected in the β -subunits
FEBS Letters 31, 214 - 216
- Graesslin D., Leidenberger F., Künzig H.-J., Döll T.,
Glismann D. 1975
Serum-LH activities as measured by radioimmunoassay,
radioligand-receptorassay and an in vitro-bioassay
after gel chromatography of serum
Int. Symp. SERONO Freiburg, "Ovulation in the human"
- Graesslin D., Leidenberger F.A., Lichtenberg U.,
Glismann D., Hess N., Czygan P.J.,
Bettendorf G. 1976
Existence of big and little forms of luteinizing
hormone in human serum
Acta Endocrinol. im Druck
- Greep R.O., van Dyke H.B., Chow B.F. 1941
Use of anterior lobe of prostate gland in the assay
of metakentrin
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 46, 644 - 649
- Griffiths B.W., Godard A. 1975
The molecular heterogeneity and instability of radioiodinated human chorionic gonadotrophin
Clin. Biochem. 8, 400 - 408
- Grinwich D.L., Hichens M.,
Behrman H.R. 1976
Control of the LH receptor by prolactin and prostaglandin $F_{2\alpha}$ in rat corpora lutea
Biol. Reprod. 14, 212 - 218

Guyda H.J. 1975

Heterogeneity of human growth hormone and prolactin secreted in vitro: Immunoassay and radio-receptor assay correlations

J. Clin. Endocrinol. Metab. 41, 953 - 967

van Hall E.V., Vaitukaitis J.L., Ross G.T., Hickman J.W., Ashwell G. 1971

Immunological and biological activity of HCG following progressive desialylation

Endocrinology 88, 456 - 464

Han Seong S., Rajaniemi H.J., Cho M.I., Hirshfield A.N., Midgley Jr. A.R. 1974

Gonadotropin receptor in rat ovarian tissue. II. Subcellular localization of LH binding sites by electron microscopic radioautography

Endocrinology 95, 589 - 598

Haour F., Saxena B.B. 1974

Characterization and solubilization of gonadotropin receptor of bovine corpus luteum

J. Biol. Chem. 249, 2195 - 2205

Hartl M. 1974

Versuche zur Freisetzung von Luteinisierungshormon mit einem synthetischen Releasinghormon sowie zur Wirkung von Prostaglandinen auf die Zyklussteuerung beim Rind

Vet. med. Dissertation, München

Haynes Jr. R.C., Berthet L. 1957

Studies on the mechanism of action of adrenocorticotropic hormone

J. Biol. Chem. 225, 115 - 124

- Hennen G., Prusik Z., Maghuin-Rogister G. 1971
Porcine luteinizing hormone and its subunits
Eur. J. Biochem. 18, 376 - 383
- Hichens M., Grinwich D.L., Behrman H.R. 1974
PGF_{2α}-induced loss of corpus luteum gonadotropin
receptors
Prostaglandins 7, No. 6: 449 - 458
- Hilgenfeldt U., Merz W.E., Brossmer R. 1976
The role of subunit bound sialic acid for the biolo-
gic functions of HCG
V. International Congress of Endocrinology, Hamburg,
Abstract Nr. 329 p. 135
- Holohan K.N., Murphey R.F., Buchanan K.D.,
Elmore D.P. 1973
Enzymic iodination of polypeptide hormones for radio-
immunoassay
Clin. Chim. Acta 45, 153 - 157
- Holt J.A., Richards J.S., Midgley Jr. A.R.,
Reichert Jr. L.E. 1976
Effect of prolactin on LH receptor in rat luteal cells
Endocrinology 98, 1005 - 1013
- Höfer F. 1973
Wirkung eines synthetischen LH/FSH-Releasinghormons
auf die Freisetzung des Luteinisierungshormons und
auf die Ovarfunktion beim Rind
Vet.-med. Dissertation München

- Hunter W.M., Greenwood F.C. 1962
Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity
Nature 194, 495 - 496
- Imura H., Sparks L.L., Grodsky G.M.,
Forsham P.H. 1965
Immunologic studies of ACTH: Dissociation of biologic and immunologic activities
J. Clin. Endocrinol. Metab. 25, 1361 - 1369
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN)
1975
The nomenclature of Peptide Hormones
Eur. J. Biochem. 55, 485 - 486
- Kammerman S., Canfield R.E., Kolena J.,
Channing C.P. 1972
The binding of iodinated hCG to porcine granulosa cells
Endocrinology 91, 65 -74
- Kammerman S., Ross J. 1975
Increase in numbers of gonadotropin receptors on granulosa cells during follicle maturation
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41, 546 - 550
- Karg H. 1957
Ascorbinsäuredynamik im Ovar als Gonadotropinnachweis
Klin. Wochenschr. 35, 643
- Karg H., Schams D., Böhm S. 1969
Vergleich von radioimmunologischen und biologischen LH-Bestimmungen im Rinderblut
Symp. Dtsch. Ges. Endocrin. 15, 324 - 325

- Ketelslegers J.M., Catt K.J. 1974
Receptor binding properties of ^{125}J -hFSH prepared
by enzymatic iodination
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39, 1159 - 1162
- Ketelslegers J.M., Knott G.D., Catt K.J. 1975
Kinetics of gonadotropin binding by receptors of
the rat testis. Analysis by a nonlinear curvefit-
ting method
Biochemistry 14, 3075 - 3083
- Ketelslegers J.M., Hsueh A.J., Hetzel W.D.,
Catt K.J. 1976
Induction of luteinizing hormone receptors and LH
sensitivity in the immature rat testis by follicle
stimulating hormone
V. International Congress of Endocrinology, Hamburg,
Abstract Nr. 519 p. 212
- Korenman S.G., Perrin L.E., McCallum T.P. 1969
A radioligand-assay system for estradiol measurement
in human plasma
J. Clin. Endocrinol. Metab. 29, 879 - 883
- Kramer R.M., Holdaway I.M., Crigthon D.B., McNeilly A.S.,
Rees L.H., Chard T. 1976
Comparison of the redox bioassay with other assays
for luteinizing hormone
J. Endocrinol. 69, 205 - 211
- De Kretser D.M. 1967
The fine structure of the testicular interstitial
cells in man of normal androgenic status
Z. Zellforsch. 80, 594 - 609

- De Kretser D.M., Catt K.J., Burger H.G.,
Smith G.H. 1969
Radioautographic studies on the localization of
 ^{125}J -labelled human luteinizing and growth hormone
in immature male rats
J. Endocrinol. 43, 105 - 111
- De Kretser D.M., Catt K.J., Paulsen C.A. 1971
Studies on the in vitro testicular binding of iodinated luteinizing hormone in rats
Endocrinology 88, 332 - 337
- Landefeld T.D., McShan W.H. 1974
Equine luteinizing hormone and its subunits.
Isolation and physicochemical properties
Biochemistry 13, 1389 - 1393
- Landesman R., Saxena B.B. 1976
Results of the first 1000 radioreceptorassays for the determination of human chorionic gonadotropin: A new, rapid, reliable and sensitive pregnancy test
Fertility and Sterility 27, 357 - 368
- Lee C.Y., Ryan R.J. 1971
The uptake of human luteinizing hormone (hLH) by slices of luteinized rat ovaries
Endocrinology 89, 1515 - 1523
- Lee C.Y., Ryan R.J. 1972
Luteinizing hormone receptors: Specific binding of human luteinizing hormone to homogenates of luteinized rat ovaries
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3520 - 3523

- Lee C.Y., Ryan R.J. 1973 a
Luteinizing hormone receptors in luteinized
rat ovaries
In: Receptors for Reproductive Hormones.
Eds.: O'Malley B.W., Means A.N.,
Plenum Press, New York, pp. 419 - 430
- Lee C.Y., Ryan R.J. 1973 b
Interaction of ovarian receptors with human
luteinizing hormone and human chorionic gona-
dotropin
Biochemistry 12, 4609 - 4615
- Lee C.Y., Ryan R.J. 1974 a
Purification of the LH-HCG receptor from lut-
einized rat ovaries
In: Gonadotropins and Gonadal Function.
Ed.: Moudgal N.R., Academic Press, New York,
pp. 444 - 459
- Lee C.Y., Ryan R.J. 1974 b
Estrogen stimulation of human chorionic gona-
dotropin binding by luteinized rat ovarian slices
Endocrinology 95, 1691 - 1693
- Lee C.Y., Ryan R.J. 1975
Radioreceptor assay for human chorionic gona-
dotropin
J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, 228 - 233
- Lee C.Y. 1976
The porcine ovarian follicle: III. Development
of chorionic gonadotropin receptors associated
with increase in adenyl cyclase activity during
follicle maturation
Endocrinology 99, 42 - 48

Lefkowitz R.J., Roth J., Pastan I. 1970
Radioreceptor assay of adrenocorticotrophic hormone: New approach to assay of polypeptide hormones in plasma

Science 170, 633 - 635

Leidenberger F., Reichert Jr. L.E. 1972 a
Evaluation of a rat testis homogenate radioligand receptor assay for human pituitary LH

Endocrinology 91, 901 - 909

Leidenberger F., Reichert Jr. L.E. 1972 b
Studies on the uptake of human chorionic gonadotropin and its subunits by rat testicular homogenates and interstitial tissue

Endocrinology 91, 135 - 143

Leidenberger F., Pahnke U., Braendle W.,
Graesslin D. 1974
Versuche zur Ablösung von LH-Rezeptoren von Leydig-Zellmembranfraktionen

20. Sym. Dt. Ges. für Endokr., Tübingen,
Abstrakt 1 - 4

Leidenberger F.A., Willaschek R., Pahnke V.G.,
Reichert Jr. L.E. 1976
Application of a radioligand receptor assay for determination of luteinizing hormone in human serum

Acta Endocrinol. 81, 54 - 72

Levin R.M., Rao Ch., Yussman M.A. 1975
The measurement of human chorionic gonadotropin-luteinizing hormone levels in plasma by means of radioreceptorassay

Fertility and Sterility 26, 190 - 191

- Li C.H., Starman B. 1964
Molecular weight of sheep pituitary interstitial cell-stimulating hormone
Nature 202, 291 - 292
- Liu W.K., Nahm H.S., Sweeney C.M., Lamkin W.M.,
Baker H.N., Ward D.N. 1972
The primary structure of ovine luteinizing hormone. I.
J. Biol. Chem. 247, 4351 - 4362
- Liu W.K., Nahm H.S., Sweeney C.M.,
Holcomb G.N., Ward D.N. 1972
The primary structure of ovine luteinizing hormone. II.
J. Biol. Chem. 247, 4365 - 4381
- Loeber J.G., Lequin R.M. 1975
Pleomorphism of human pituitary luteinizing hormone
Acta Endocr. (Kbh) Suppl. 199, 191
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L.,
Randall R.J. 1951
Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275
- Maghuin-Rogister G., Dockier A. 1971
The amino acid sequence of the luteinizing hormone β -subunit
FEBS Letters 19, 209 - 213

- Maghuin-Rogister G.C., Hennen G.P. 1971
Bovine luteinizing hormone. Study of the primary structure around the carbohydrate attachment sites of the luteinizing hormone α -subunit
Eur. J. Biochem. 21, 489 - 497
- Maghuin-Rogister G., Combarrous Y., Hennen G. 1973
The primary structure of the porcine luteinizing hormone α -subunit
Eur. J. Biochem. 39, 255 - 263
- Maghuin-Rogister G., Hennen G. 1973
Luteinizing hormone. The primary structures of the β -subunit from bovine and porcine species
Eur. J. Biochem. 39, 235 - 253
- Mancini R.E., Castro A., Seigneur A.C. 1967
Histological localization of follicle-stimulating and luteinizing hormones in the rat testis
J. Histochem. Cytochem. 15, 516 - 525
- Marsh J.M., Butcher R.W., Savard K., Sutherland E.W. 1966
The stimulatory effect of luteinizing hormone on adenosine 3', 5'-monophosphate accumulation in corpus luteum slices
J. Biol. Chem. 241, 5436 - 5440
- Marsh J.M., Savard K. 1966
The stimulation of progesterone synthesis in bovine corpora lutea by adenosine 3', 5'-monophosphate
Steroids 8, 133 - 148

- Marsh J.M. 1976
The role of cyclic AMP in gonadal steroidogenesis
Biol. Reprod. 14, 30 - 53
- Marsh J.M., Ling W., Lemaire W. 1976
A stimulation of protein kinase activity in the corpus luteum by luteinizing hormone
V. International Congress of Endocrinology, Hamburg, Abstract Nr. 630 p. 259
- Means A.R., Vaitukaitis J. 1972
Peptide hormone "receptors": Specific binding of ^3H -FSH to testis
Endocrinology 90, 39 - 46
- Menon K.M.J., Kiburz J. 1974
Isolation of plasma membranes from bovine corpus luteum possessing adenylate cyclase, ^{125}J -HCG binding and Na-K-ATPase activities
Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 363 - 371
- Midgley A.R.Jr., Ram J.S. 1965
Radioimmunoassay for human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone
Fed. Proc. 24, 162.
- Morgan F.J., Canfield R.E. 1971
The nature of the subunits of human chorionic gonadotropin
Endocrinology 88, 1045 - 1053

- Moyle W.R., Ramachandran J. 1973
Effect of LH on steroidogenesis and cyclic
AMP accumulation in rat Leydig cell prepara-
tions and mouse tumor Leydig cells
Endocrinology 93, 127 - 134
- Neher R., Milani A. 1976
The role of Ca^{++} as messenger in adrenal ste-
roidogenesis
V. International Congress of Endocrinology,
Hamburg, Abstract Nr. 170, p. 69
- Niswender G.D., Reichert L.E.Jr., Midgley A.R.Jr.
Nalbandov A.V. 1969
Radioimmunoassay for bovine and ovine luteini-
zing hormone
Endocrinology 84, 1166 - 1173
- Pahnke V.G., Leidenberger F.A.,
Künzig H.J. 1975
Correlation between HCG (LH)-binding capacity,
Leydig cell number and secretory activity of rat
testis throughout pubescence
Acta Endocrinol. 79, 610 - 618
- Papkoff H., Gospodarowicz D., Candiotti A.,
Li C.H. 1965
Preparation of ovine interstitial cell-stimula-
ting hormone in high yield
Arch. Biochem. 111, 431 - 438
- Papkoff H., Samy T.S.A. 1967
Isolation and partial characterization of the
polypeptide chains of ovine interstitial cell-
stimulating hormone
Biochim. Biophys. Acta 147, 175 - 177

- Papkoff H., Ekblad M. 1970
Ovine follicle stimulating hormone: Preparation and characterization of its subunits
Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 614 - 621
- Papkoff H. 1971
The subunit character of interstitial cell-stimulating hormone and follicle-stimulating hormone
In: Protein and Polypeptide Hormones. I. Excerpta Medica, Eds.: Margoulies M., Greenwood F.C., Amsterdam pp. 73 - 79
- Parlow A.F. 1958
A rapid bioassay method for LH and factors stimulating LH secretions
Fed. Proc. 7, 402
- Perkins J.P. 1973
Adenyl cyclase
In: Advances in Cyclic Nucleotide Research. Vol. 3, Eds.: Greengard P., Robison G.A., Raven Press, N.Y., pp. 1- 64
- Pierce J.G., Wynston C.K. Carsten M.E. 1958
Studies on the purification of thyrotropin
Biochim. Biophys. Acta 28, 434 - 435
- Pierce J.G., Bahl O.P., Cornell J.S., Swaminathan N. 1971
Biologically active hormones prepared by recombination of the α -chain of human chorionic gonadotropin and the hormone-specific chain of bovine thyrotropin or of bovine luteinizing hormone
J. Biol Chem. 246, 2321 - 2324

- Pliska V. 1976
Stimulus-response-coupling in cAMP mediated systems: A sequential model
V. International Congress of Endocrinology, Hamburg, Abstract Nr. 167, p. 68
- Prentice L.G., Ryan R.J. 1975
LH and its subunits in human pituitary, serum and urine
J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, 303 - 312
- Qazi M. H., Romani P., Diczfalusy E. 1974
Discrepancies in plasma LH activities as measured by radioimmunoassay and an in vitro bioassay
Acta Endocrinol. 77, 672 - 685
- Rabinowitz D., Benveniste R., Bell J. 1974
Heterogeneity of human luteinizing hormone
Israel J. Med. Sci. 10, 1272 - 1279
- Rajaniemi H., Vanha-Perttula T. 1972
Specific receptor for LH in the ovary: Evidence by radioautographic and tissue fractionation
Endocrinology 90, 1 - 9
- Rajaniemi H.J., Hirshfield A.N., Midgley Jr. A.R. 1974
Gonadotropin receptors in rat ovarian tissue. I. Localization of LH binding sites by fractionation of subcellular organelles
Endocrinology 95, 579 - 588

- Ramachandran J., Sairam M.R. 1975
The effects of interstitial cell-stimulating hormone, its subunits and recombinants on isolated rat Leydig cells
Arch. Biochem. Biophys. 167, 294 - 300
- Rao Ch. V. 1975
The presence of gonadotropin and prostaglandin E receptors in the cell membranes of bovine corpora lutea throughout pregnancy
Fertility and Sterility 26, 1185 - 1189
- Rasmussen H. 1970
Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine monophosphate
Science 170, 404 - 412
- Rathnam P.A., Saxena B.B. 1972
Subunits of FSH from human pituitary glands
In: Gonadotropins, Eds.: Saxena B.B., Beling C.G., Gandy H.M., New York, Wiley-Interscience, pp. 120 - 131
- Reichert Jr. L.E. 1961
Differential effect of hydrogen peroxide upon the biological activity of thyroide stimulating hormone and luteinizing hormone
Endocrinology 69, 398 - 400
- Reichert Jr. L.E., Midgley Jr. A.R. 1968
Preliminary studies on the effect of urea and chymotrypsin on the molecular biological and immunological properties of human follicle stimulating hormone and luteinizing hormone
In: Gonadotropins, Ed.: Rosenberg E. Los Altos, Calif. Geron-X Inc. pp. 25 - 31

- Reichert Jr. L.E., Midgley Jr. A.R., Niswender G.D.,
Ward D.N. 1970
Formation of a hybrid molecule from subunits of
human and bovine luteinizing hormone
Endocrinology 87, 534 - 541
- Reichert Jr. L.E., Leidenberger F.,
Trowbridge C.G. 1973
Studies on luteinizing hormone and its subunits:
Development and application of a radioligand re-
ceptor assay and properties of the hormone-recep-
tor interaction
Rec. Prog. Horm. Res. 29, 497 - 532
- Reichert Jr. L.E., Lawson Jr. G.M., Leidenberger F.,
Trowbridge C.G. 1973
Influence of α - and β -subunits on the kinetics of
formation and activity of native and hybrid mole-
cules of LH and human gonadotropin
Endocrinology 93, 938 - 946
- Reichert Jr. L.E., Ramsey R.B., Carter E.B. 1975
Application of a tissue receptor assay to measure-
ment of serum follitropin (FSH)
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41, 634 - 637
- Richards J.S., Midgley Jr. A.R. 1974
Hormone receptors and luteal cell function
J. Steroid. Biochem. 5, 348 - 349, Abstract Nr. 222
- Richards J.S. 1975
Estradiol receptor content in rat granulosa cells
during follicular development: Modification by
estradiol and gonadotropins
Endocrinology 97, 1174 - 1184

- Richards J.S., Midgley Jr. A.R. 1976
Protein hormone action: A key to understanding
ovarian follicular and luteal cell development
Biol. Reprod. 14, 82 - 94
- Robison G. A., Butcher R.W.,
Sutherland E.W. 1967
Adenyl cyclase as an adrenergic receptor
Ann. N.Y. Acad. Sci. 139, 703 - 723
- Rodbell M., Lin M.C., Salomon Y., Londos C., Harwood J.P.,
Martin B.R., Rendell M., Berman M. 1975
Role of adenine and guanine nucleotides in the ac-
tivity and response of adenylate cyclase systems
to hormones. Evidence for multisite transition
states
Adv. Cyclic Nuc. Res. 5, 3 - 29
- Roos P., Nyberg L., Wide L., Gemzell C. 1975
Human pituitary luteinizing hormone. Isolation and
characterization of four glycoproteins with lut-
einizing activity
Biochim. Biophys. Acta 405, 363 - 379
- Ryan R.J., Lee C.Y. 1976
The role of membrane bound receptors
Biol. Reprod. 14, 16 - 29
- Sairam M.R., Papkoff H., Li C.H. 1972 a
Human pituitary interstitial cell stimulating hor-
mone: Primary structure of the α -subunit
Biochem. Biophys. Res. Comm. 48, 530 - 537
- Sairam M.R., Papkoff H., Li C.H. 1972 b
The primary structure of ovine interstitial cell-
stimulating hormone. I.
Arch. Biochem. Biophys. 153, 554 - 571

- Sairam M.R., Li C.H. 1975
Human pituitary lutropin. Isolation, properties and the complete amino acid sequence of the β -subunit
Biochim. Biophys. Acta 412, 70 - 81
- Schams D., Karg H. 1969
Radioimmunologische LH-Bestimmung im Blutserum vom Rind unter besonderer Berücksichtigung des Brunstzyklus
Acta Endocrinol. 61, 96 - 103
- Schams D., Schindlmayr R. 1973
Studies on in-vitro-bioassay (Radioligand receptor assay) of luteinizing hormone
Acta Endocrinol. (Kbh) Suppl. 173, 60
Abstract Nr. 60
- Schindlmayr R. 1973
Methodische Versuche zur Bestimmung des Luteinisierungshormons im Rinderblut mit Hilfe eines Rezeptortests.
Vet.-med. Dissertation München
- Shiu R.P., Friesen H.G. 1974
Properties of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland
J. Biochem. 140, 301 - 311
- Simpson R.J., Dufau M.L., Podesta E., Catt K.J. 1976
Hormonal stimulation of protein kinase and nuclear phosphorylation in Leydig cells
V. International Congress of Endocrinology, Hamburg, Abstract Nr. 171, p. 69

- Snook R.B., Saatman R.R., Hansel W. 1971
Serum progesterone and luteinizing hormone
levels during the bovine estrus cycle
Endocrinology 88, 678 - 686
- Squire P.G., Li C.H. 1959
Purification and properties of interstitial
cell-stimulating hormone from sheep pituitary
glands
J. Biol. Chem. 234, 520 - 525
- Steiner D.F., Cunningham D., Spigelman L.,
Aten B. 1968
Insulin biosynthesis: Evidence of a precursor
Science 157, 697 - 700
- Swaminathan N., Bahl O.P. 1970
Dissoziation and recombination of the subunits of
human chorionic gonadotropin
Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 422 - 427
- Tertrin-Clary C., De la Llosa P. 1976
Stimulation of rat ovary adenylate cyclase by
different LH derivatives obtained by modification
of the lysine residues
V. International Congress of Endocrinology, Hamburg,
Abstract Nr. 861, p. 355
- Tomoda Y., Miwa T., Ishizuka N. 1975
Radioligand receptor assay for urinary and serum hCG
J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, 644 - 651
- Tsuruhara T., Dufau M.L., Hickman J.,
Catt K.J. 1972
Biological properties of hCG after removal of ter-
minal sialic acid and galactose residues
Endocrinology 91, 296 - 301

- Wallis M. 1975
The molecular evolution of pituitary hormones
Biol. Rev. 50, 35 - 98
- Ward D.N., McGregor K.F., Griffin A.C. 1959
Chromatographie of luteinizing hormone from
sheep pituitary glands
Biochim. Biophys. Acta 32, 305 - 314
- Watson J. 1972
Plasma levels of luteinizing hormones in women and
in rats as measured by bioassay
J. Endocrinol. 54, 119 - 123
- WeiB T.J., Seamark R.F., McIntosh J.E.A.,
Moor R.M. 1976
Cyclic AMP in sheep ovarian follicles: Site of pro-
duction and response to gonadotropins
J. Reprod. Fert. 46, 347 - 353
- Yalow R.S., Berson S.A. 1959
Assay of plasma insulin in human subjects by immu-
nological methods
Nature 184, 1648 - 1649
- Zeleznik A.J., Midgley Jr. A.R., Reichert Jr. L.E.
1974
Granulosa cell maturation in the rat: Increased bin-
ding of human chorionic gonadotropin following treat-
ment with follicle-stimulating hormone in vivo
Endocrinology 95, 818 - 825

Sairam M.R., Samy T.S.A., Papkoff H., Li C.H.,

1972 c

The primary structure of ovine interstitial cell-stimulating hormone. II.

Arch. Biochem. Biophys. 153, 572 - 586

Schams D., Schallenberger E. 1976

Heterologous radioimmunoassay for bovine follicle-stimulating hormone and its application during the oestrous cycle in cattle.

Acta Endocrinol. 81, 461 - 473

Herrn Professor Dr. Heinrich Karg möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas, seine wissenschaftlichen Anregungen, sowie für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Institut meinen besonderen Dank sagen.

Insbesondere danke ich auch Herrn Priv. Doz. Dr. Dieter Schams für die labortechnische Einarbeitung und die zahlreichen Ratschläge und Diskussionen.

LEBENS LAUF

Am 5.10.1949 wurde ich, Christiane Menzer, als zweite Tochter des Physikers Dr. Ernst Menzer und seiner Ehefrau Ursula Menzer, geb. Hruschka, in Fürth/Bay. geboren.

Von 1956 bis 1960 besuchte ich die Volksschule in München. Anschließend trat ich in das Neusprachliche Gymnasium der Armen Schulschwestern am Anger in München über und legte dort 1969 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1969/70 begann ich das Studium der Tiermedizin an der Universität München, das ich im Herbst 1974 mit dem Staatsexamen abschloß.

Von Anfang November 1974 bis Dezember 1976 arbeitete ich am Institut für Physiologie der Südd. Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Weihenstephan der Technischen Universität München. In den ersten zwei Monaten war ich dort als wissenschaftliche Hilfskraft angestellt, bis ich anschließend von Januar 1975 bis Juni 1976 ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz erhielt. Danach hatte ich für weitere zwei Monate eine Stelle als Verwalterin der Dienstgeschäfte eines wissenschaftl. Assistenten. Während dieser Zeit fertigte ich die vorliegende Dissertation an.

